

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**Desenvolvimento de um método para avaliar a
sobrevivência/morte de *Mycobacterium tuberculosis* em
macrófagos humanos por fluorimetria**

Marta Maria Seixas Barroso

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**Desenvolvimento de um método para avaliar a
sobrevivência/morte de *Mycobacterium tuberculosis*
em macrófagos humanos por fluorimetria**

Marta Maria Seixas Barroso

Dissertação de mestrado orientada pelos

Prof. Doutora Elsa Anes, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor Mário Santos, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

O trabalho da presente dissertação foi realizado na Unidade de Interação Micobactéria-Hospedeiro do Centro de Patogénese Molecular-URIA da Faculdade de Farmácia de Lisboa, financiado pelo projecto PTDC/SAL-MII/ 098024/2008 e com a atribuição de bolsa de investigação com a referência BI/ RTDC/SAL-MII/ 098024/2008 no âmbito deste projecto à mestranda.

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2010

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Elsa Anes, por me ter recebido no seu laboratório, pela supervisão e conhecimento que comigo partilhou.

Gostaria também de agradecer ao meu orientador interno, Professor Mário Santos.

À ADEIM (Associação para o Desenvolvimento do Ensino e da Investigação em Microbiologia), que me possibilitou a bolsa de investigação, ao CPM-URIA (Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa) e ao Instituto de Medicina Molecular pelo apoio institucional e logístico para desenvolver o trabalho.

Ao José Rino, responsável pela Unidade de Bioluminescência do IMM, pela construção da Macro do ImageJ e pela sua disponibilidade em esclarecer todas as dúvidas.

Aos meus colegas de laboratório, pela colaboração e partilha de conhecimentos e também pelos bons momentos de trabalho e convívio durante este ano.

Aos meus amigos, pelo apoio e estímulo, sem os quais este trabalho teria sido muito mais difícil.

Por fim, aos meus pais pelo constante incentivo, apoio e compreensão que demonstraram não só durante este ano como em todas as etapas da minha vida.

Abreviaturas

AMP	Péptidos antimicrobianos
BCG	Calmette-Guérin bacillus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferão (<i>Interferon</i>)
IL	Interleucina
iNOS	Sintase indutível do óxido nítrico (<i>Inductible Nitric Oxide Synthase</i>)
LAMP-1	Proteína membranar associada a lisossomas 1 (<i>Lysosomal associated membrane protein 1</i>)
LBPA	Ácido lisobifosfatídico (<i>Lysobisphosphatidic acid</i>)
LPS	Lipopolissacárido
MOI	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-κB	Nuclear factor κB
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
o.n.	Durante a noite
p.i.	Pós infecção
qRT-PCR	Reacção em cadeia da polimerase em tempo real
RNI	Intermediários reactivos de nitrogénio
ROI	Intermediários reactivos de oxigénio
TB	Tuberculose
TNF	Factor de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
UFC	Unidades formadoras de colónias

Símbolos

Alpha - α

Beta - β

Gamma - γ

Resumo

A tuberculose (TB) continua a representar um enorme problema de saúde pública, causando anualmente a morte de cerca de 3 milhões de pessoas. A antibioterapia disponível falha, devido ao desenvolvimento de resistências genéticas e, para agravar a situação não existe, actualmente, um sistema de vacinação eficaz.

Este trabalho teve como objectivo o estabelecimento de um ensaio fluorimétrico para a medição rápida e em larga escala, da sobrevivência/morte intracelular de *Mycobacterium* spp., incluindo *M. tuberculosis*, em macrófagos, utilizando repórteres fluorescentes distintos para as bactérias e macrófagos. Os nossos resultados mostraram que a quantificação fluorimétrica de micobactérias que exprimem a proteína verde fluorescente GFP permite avaliar a sobrevivência em macrófagos infectados de forma semelhante ao método standard de contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Este método apresenta-se como uma alternativa rápida, menos laboriosa e dispendiosa ao método tradicional de contagem de UFC e, como tal, adequada à realização de rastreios em larga escala.

Constituirá assim, certamente, uma ferramenta vantajosa para o rastreio de novos agentes terapêuticos, assim como para a procura de potenciais alvos terapêuticos, tanto ao nível do hospedeiro como da bactéria.

Para a aplicação do método é necessário a utilização de um controlo positivo da morte intracelular bacteriana, tendo-se testado o efeito do lipopolissacárido (LPS), potente activador de macrófagos previamente descrito na literatura. Surpreendentemente, os nossos resultados revelaram que, na infecção por *M. smegmatis* o tratamento dos macrófagos com LPS durante a noite resulta num aumento da sobrevivência intracelular ao contrário do esperado efeito bactericida. Demonstrou-se que este efeito parece estar relacionado com um atraso da maturação do fagossoma e não numa redução de libertação de radicais livres.

Palavras-chave: fluorimetria; cultura celular; GFP (*green fluorescent protein*); lipopolissacárido; iNOS; activação de macrófagos; maturação do fagossoma.

Abstract

Tuberculosis remains one of the most significant Public Health issues causing around 3 million deaths annually. Due to the increase of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, the available antibiotics fail in the treatment of the disease and there is still no effective prophylactic vaccine.

This work aims to establish a fluorimetric assay for a rapid and high-throughput measurement of intracellular survival/death of *Mycobacterium* spp., including *M. tuberculosis*, in macrophages using fluorescent reporters for both the bacteria and macrophages. Our results show that fluorimetric quantification of GFP-expressing mycobacteria allows the analysis of survival inside infected macrophages in a similar manner to the standard method of counting colony-forming units (CFU). This method constitutes a faster, cheaper and less laborious alternative to the traditional CFU method and suitable for high-throughput screenings.

Consequently, this assay will surely be a valuable tool for the screening of new therapeutic agents as well as for the search of new therapeutic targets present in the host or bacteria.

For the application of the method a positive control for intracellular bacterial death is needed, therefore we tested the effect of the lipopolysaccharide (LPS), a previously described potent macrophage activator. Surprisingly, our results show that in *M. smegmatis* infection, overnight LPS treatment of macrophages results in an increased intracellular survival contrary to the expected bactericidal effect. It was shown that this effect is related to a delay of phagosome maturation instead of a reduced release of free oxygen radicals.

Palavras-chave: fluorimetry; cell culture; GFP (*green fluorescent protein*); lipopolysaccharide; iNOS; macrophage activation; phagosome maturation.

ÍNDICE:

Agradecimentos - i

Abreviaturas - ii

Resumo - iii

Abstract - iv

Índice - v

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Problemática da tuberculose	1
1.2. Imunidade inata na tuberculose	1
1.2.1. Mecanismos de imunidade inata na tuberculose	2
1.2.1.1. Radicais livres	2
1.2.1.2. Maturação do fagossoma em fagolisossoma	3
1.2.2. Outros mecanismos bactericidas	5
1.2.2.1. Péptidos antimicrobianos	5
1.2.2.2. Produção de citocinas e quimiocinas	5
1.2.2.3. Apoptose vs necrose	7
1.3. Métodos convencionais de contagem de UFC para medir sobrevivência intracelular de Mtb – limitações para testes em larga escala	7
1.4. Activação de macrófagos com LPS	8
1.5. Objectivos do trabalho de tese	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1. Cultura de células	10
2.2. Cultura de bactérias	10
2.3 Infecção de macrófagos	11
2.4. Marcação dos núcleos de THP-1 com Hoechst	11
2.5 Inibição da fagocitose com citocalasina D	11
2.6. Construção do plasmídeo pTagBFP-Nuc	12
2.7 Transfecção células HEK 293T	12
2.8 RT-qPCR	13
2.9 Microscopia de fluorescência	13
2.10. Análise estatística	14
3. RESULTADOS	15
3.1. Métodos para quantificação do número de macrófagos em placa	15
3.1.1. Marcação de THP-1 com Hoechst	15
3.1.2. Construção de um vector de expressão para marcação nuclear dos macrófagos e transfecção em células HEK 293T	15

3.2. Estabelecimento do método de avaliação da sobrevivência intracelular de micobactérias por fluorimetria e comparação com o método clássico	16
3.3. Controlo negativo de internalização usando citocalasina D	17
3.4. Aferição da sobrevivência intracelular: Lipopolissarário (LPS) como controlo positivo	18
3.4.1. Efeito da concentração do LPS na infecção de macrófagos J774 por <i>M. smegmatis</i>	18
3.4.2. Efeito da origem do LPS na infecção de macrófagos J774 por <i>M. smegmatis</i>	20
3.4.3. Efeito do tempo de estimulação com LPS na infecção de macrófagos J774 por <i>M. smegmatis</i>	21
3.4.4. <i>Listeria monocytogenes</i> como controlo positivo da morte intracelular em macrófagos J774 activados por LPS	21
3.4.5. Mecanismo de acção bactericida dependente de LPS	23
3.4.5.1. Activação de macrófagos: expressão de iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β e TLR4 nas células J774 infectadas por <i>M. smegmatis</i>	23
3.4.5.2. Maturação do fagossoma:	25
3.4.5.2.1. Co-localização com vesículas ácidas	25
3.4.5.2.2. Co-localização com marcador da fase tardia das vias endocíticas	26
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. Introdução

1.1. Problemática da tuberculose

A tuberculose (TB) continua a ter um enorme impacto na saúde pública em todo o mundo, ocorrendo anualmente 8-10 milhões de novos casos [1]. O seu agente causal, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é um dos patógenos mais bem sucedidos, estimando-se que mais de um terço da população mundial esteja infectada [2]. Porém, apenas 5 a 10% dos indivíduos infectados correm o risco de desenvolver tuberculose durante a sua vida. No entanto, apesar de a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ser eficazmente contida pelo sistema imunitário do hospedeiro em cerca de 90% dos casos, a tuberculose pulmonar provoca anualmente 2-3 milhões de mortes em todo o mundo [3].

A única vacina disponível, Bacille Calmette-Guérin (BCG), embora proteja contra a disseminação da doença em recém-nascidos e crianças, possui baixa eficácia contra a TB pulmonar, o que realça a necessidade de um melhor regime de vacinação [4]. O contínuo aumento do número de casos, sobretudo em regiões onde a prevalência da infecção por HIV é elevada e, mais recentemente, a identificação de estirpes de micobactérias multirresistentes (MDR) e extensamente resistentes (XDR) a medicamentos, vieram reafirmar a TB como uma das principais ameaças em saúde pública [5].

A tuberculose miliar, caracterizada pela disseminação hematogénea de um grande número de micobactérias no organismo, é a manifestação mais grave da doença. No outro extremo do espectro clínico, encontra-se a tuberculose pleural, que é geralmente auto-limitada. Embora possa desenvolver-se em qualquer parte do corpo, a tuberculose apresenta-se geralmente como infecção pulmonar, abrangendo desde infiltração ligeira a doença crónica, cavitária e severamente destrutiva. As diferentes manifestações da infecção por Mtb reflectem o balanço entre o bacilo e os mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo que a qualidade da defesa deste último determina o resultado [6].

O *Mycobacterium tuberculosis* é transmitido por aerossóis e ao penetrar nos alvéolos pulmonares é fagocitado por célula fagocíticas profissionais, incluindo macrófagos, onde sobrevive num fagossoma que não funde com lisossomas. Deste modo, o *Mycobacterium* evita o contacto com as proteases ácidas e a exposição aos mecanismos bactericidas que operam nos lisossomas, prevenindo a sua degradação e o processamento e apresentação de antígenos bacterianos ao sistema imune [7]. A resposta imune montada pelo hospedeiro é complexa, envolvendo componentes da imunidade inata e adaptativa que, na maioria dos casos, sequestram o patógeno em estruturas denominadas granulomas. Estes são complexos imunes organizados de macrófagos diferenciados, linfócitos e outras células [8] cuja principal função é de contenção, prevenindo a disseminação das micobactérias, que persistem na forma de infecção assintomática de longa duração, denominada infecção latente, com o potencial risco de ocorrer reactivação mais tarde (<10%) [9]. Compreender os factores que contribuem para esta longa e complexa relação entre o patógeno e o hospedeiro é essencial para a nossa capacidade de modular as manifestações clínicas da infecção.

1.2. Imunidade inata na tuberculose

Os microrganismos invasores e outras partículas estranhas, assim como os corpos apoptóticos, são eliminados no organismo por um processo conhecido por fagocitose. Este processo é iniciado pela

interacção de receptores na membrana plasmática da célula fagocítica com os seus ligandos na superfície da partícula alvo [11].

Os macrófagos alveolares residentes são o principal tipo celular envolvido na internalização inicial do *Mycobacterium tuberculosis*. Além destes, células dendríticas e neutrófilos, sendo células fagocíticas profissionais, têm um papel preponderante no controlo da infecção [12].

Foram identificados vários receptores relacionados com a internalização de Mtb nos macrófagos. Estes incluem receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4) [13], receptores de manose e receptores scavenger classe A [14]. Nos pulmões, a internalização do Mtb pode também ser mediada por uma lectina tipo-C solúvel específica de manose, a proteína surfactante A (SP-A) [10,15].

Outro grupo de receptores, os Toll-like receptors (TLR), é provavelmente responsável pelo reconhecimento imunológico dos patógenos e consequentemente, pela sinalização celular pró-inflamatória, em vez da internalização das bactérias. Os TLR pertencem à família dos *pattern recognition receptors* (PRR), que reconhecem *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) específicos de diferentes origens [16]. No caso das micobactérias, o TLR2 e TLR4 reconhecem componentes da parede celular do Mtb e activam vias de sinalização que conduzem à activação celular e produção de citocinas, entre outras [6].

1.2.1. Mecanismos de imunidade inata na tuberculose

O macrófago constitui uma das primeiras linhas de defesa contra a infecção micobacteriana e está equipado com uma variedade de respostas microbicidas [17]. Estes mecanismos ocorrem de forma sequencial e incluem a produção de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio, a maturação do fagossoma em fagolisossoma, acompanhada de acidificação, a produção de citocinas e a apresentação de antígenos [18]. Verifica-se que, no interior dos fagossomas, as micobactérias não patogénicas, como *M. smegmatis*, conseguem ser mortas eficientemente pelos macrófagos em 24-48 h, em oposição com as micobactérias patogénicas, como Mtb, que sobrevivem dentro dos macrófagos por várias semanas [19].

1.2.1.1. Radicais livres

A libertação de óxido nítrico (NO), produzido pela sintase indutível do óxido nítrico (iNOS), representa um potente e necessário mecanismo de defesa antimicobacteriano no modelo de ratinho de infecção por Mtb [20]. Contudo, existe uma maior controvérsia relativamente ao papel do NO na morte ou limitação do crescimento de Mtb em macrófagos humanos [21], possivelmente porque a presença de NO tem sido difícil de demonstrar [22]. No entanto, provou-se recentemente que os macrófagos alveolares, mas não os monócitos do sangue, são capazes de produzir NO *in vitro*, após estimulação quer com Mtb, quer com os seus antígenos secretados e existe um crescente conjunto de evidências que indicam que o NO produzido por macrófagos humanos infectados por Mtb possui efeitos antimicobacterianos contra este patógeno [23]. O mecanismo pelo qual o NO e outras espécies reactivas de nitrogénio controlam a sobrevivência do Mtb poderá envolver a quebra do DNA bacteriano, de proteínas e/ou indução da apoptose dos macrófagos infectados [20].

Para além do NO, as células fagocíticas produzem, após estimulação com micobactérias, uma grande quantidade de outros intermediários reactivos de nitrogénio (RNI). Este processo é acentuado por citocinas inflamatórias como o IFN- γ e/ou lipopolissacáridos bacterianos (LPS) [24]. No entanto, verifica-se que as micobactérias desenvolveram mecanismos de tolerância a RNI. Estudos *in vitro* demonstram que essa tolerância é dependente da dose, do tempo e da estirpe, sendo os patógenos naturalmente mais resistentes do que os não-patógenos [25].

Os intermediários reactivos de oxigénio (ROI), produzidos pela NADPH oxidase, são geralmente considerados menos relevantes para a morte das micobactérias [26], possivelmente devido à existência de mecanismos que permitem neutralizar os efeitos tóxicos dos ROI. No caso do Mtb, um desses mecanismos envolve a acção das enzimas superóxido dismutase e catalase. A primeira transforma o superóxido em H₂O₂ e água, enquanto a segunda transforma o H₂O₂ em água e oxigénio [27]. Outro mecanismo possível poderá estar relacionado com o facto de alguns produtos micobacterianos, incluindo LAM e sulfatides, serem *scavengers* de radicais de oxigénio [28].

1.2.1.2. Maturação do fagossoma em fagolisossoma

O fagossoma recém-formado, gerado pela invaginação da membrana plasmática, não possui os componentes necessários para a degradação e eliminação dos microrganismos internalizados. Após a sua formação, o fagossoma modifica gradualmente a sua composição pela fusão sequencial com endossomas precoces, endossomas tardios e finalmente lisossomas [29]. O resultado final é um fagolisossoma que possui um pH ácido (<5), elevada concentração de enzimas hidrolíticas, defensinas e a capacidade de gerar compostos oxidativos tóxicos [30]. Este é um processo extremamente eficiente que irá matar a maioria das bactérias fagocitadas. Contudo, muitos patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para evitar a sua degradação. Estas incluem o bloqueio da maturação do fagossoma (ex.: *Mycobacterium*), a capacidade de sobreviver no fagolisossoma (ex.: *Leishmania* e *Coxiella*) ou de degradar a membrana vacuolar e escapar para o citoplasma (ex.: *Listeria* e *Shigella*) [31].

Rapidamente após a formação do fagossoma é iniciada a remodelação da sua membrana [32]. As proteínas da membrana plasmática (incluindo receptores) são removidas em grande parte dentro dos primeiros 3-5 minutos. A fusão com endossomas precoces inicia-se também dentro de minutos, num mecanismo dependente da GTPase monomérica Rab5 [9]. Como consequência os fagossomas adquirem componentes característicos destes organelos [33], nomeadamente, a presença de Rab5, receptores da transferrina, um conteúdo relativamente pobre em proteases e um pH pouco ácido próximo de 6. Os marcadores da fase precoce são em seguida reciclados da membrana fagossomal à medida que o processo de maturação progride. A aquisição de Rab7 e perda de Rab5 permite a fusão subsequente do fagossoma com endossomas tardios e lisossomas [34]. Apesar da cinética de maturação diferir fortemente dependendo do tipo de partícula fagocitada e do tipo de célula, este processo decorre normalmente em 20 minutos [33]. Como consequência da maturação o fagossoma torna-se enriquecido na presença de marcadores endossomais tardios como, por exemplo, Rab 7 e ácido liso-bifosfatídico (LBPA) [35]. O fagossoma tardio evolui então para fagolisossoma caracterizado pela presença de formas maduras das enzimas lisossomais como a catepsina D, da proteína membrana associada a lisossomas 1 (LAMP 1) e um pH ácido [33].

A aquisição de um pH ácido durante o processo de maturação deve-se principalmente à aquisição da bomba de prótons v-ATPase e é considerada essencial à actividade microbicida do fagossoma [33,36]. A acidificação do lúmen fagossomal pode exercer um efeito bactericida directo nas bactérias internalizadas [37]. Para além disso, favorece tanto a actividade lítica de várias enzimas lisossomais que possuem um pH óptimo ácido, como a produção de peróxido de hidrogénio e outras espécies reactivas de oxigénio o que requer grandes quantidades de prótons [33].

Armstrong e Hart demonstraram, há mais de 30 anos, que os fagossomas contendo Mtb são resistentes à fusão com componentes tardios da via endossomal-lisossomal [38]. Uma vez internalizadas pelos macrófagos, as micobactérias patogénicas secretam factores que bloqueiam a maturação dos fagossomas e, como resultado, residem em compartimentos que não se fundem com lisossomas nem sofrem acidificação.

O ponto exacto em que o Mtb bloqueia a maturação do fagossoma ainda não é conhecido. No entanto, a retenção de Rab5 nos fagossomas das micobactérias patogénicas e a ausência de Rab7 nos tempos normais esperados para o seu recrutamento, indicam que o processo é interrompido numa fase inicial entre os passos controlados por Rab5 e Rab7 [35,39].

Enquanto resistem à fusão com compartimentos tardios, os fagossomas contendo micobactérias virulentas viáveis interagem com compartimentos endossomais precoces. Como tal, apresentam marcadores destes organelos, como o receptor da transferrina [40] mas, em contraste com os fagossomas contendo micobactérias mortas ou a estirpe não virulenta *M. smegmatis*, excluem marcadores dos endossomas tardios, tais como a v-ATPase de prótons e a protease lisossomal Catepsina D [7]. Pensa-se que a ausência da v-ATPase de prótons é responsável pela reduzida acidificação dos fagossomas micobacterianos, que equilibram o pH a 6.2-6.3, comparativamente a um pH de 5.3-5.4 normalmente associado aos compartimentos endossomais tardios [18].

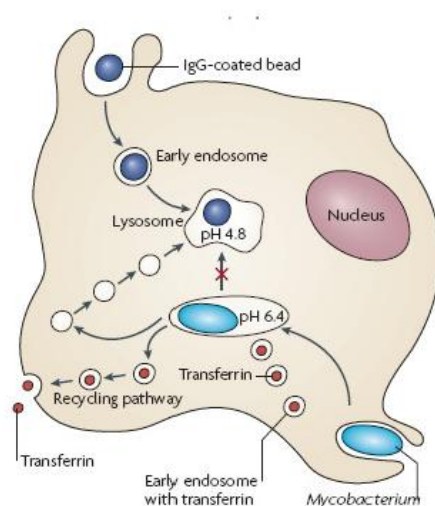


Figura 1. Tráfego intracelular de *M. tuberculosis* nos macrófagos. Após a internalização, os fagossomas contendo partículas inertes revestidas com IgG acidificam rapidamente para um pH de 5 ou inferior, e as partículas inertes são subsequentemente entregues a lisossomas. Contrariamente, os fagossomas contendo Mtb apenas acidificam para um pH 6.4 e resistem à fusão com lisossomas. Os vacúolos contendo Mtb retêm muitas das características do sistema endossomal precoce [9].

1.2.2. Outros mecanismos bactericidas

1.2.2.1. Péptidos antimicrobianos

Pensa-se que os péptidos antimicrobianos (AMP), pequenos péptidos catiónicos produzidos por diversos organismos hospedeiros, são efectores significativos da imunidade inata através da sua actividade imunomodulatória e morte directa de microrganismos [41]. Os AMP são principalmente proteínas secretadas e os seus principais locais de actividade são as superfícies mucosas, que podem ser portas de entrada bacteriana. No entanto, conhecem-se poucos AMP que se sabe actuarem em bactérias, principalmente dentro de macrófagos e células epiteliais [42].

Entre os péptidos antimicrobianos, as defensinas e catelicidinas humanas desempenham um importante papel na ligação entre a imunidade inata e adquirida [43,44].

Nas infecções micobacterianas, o principal papel das defensinas é a lise directa das micobactérias através da permeabilização das membranas celulares [45]. Acredita-se que a ligação electrostática entre grupos arginina das defensinas catiónicas e as membranas ricas em fosfolípidos aniónicos induz a permeabilização para formar canais regulados por voltagem, causando a perda de metabolitos intracelulares [45]. Foi demonstrado que algumas defensinas também possuem actividades quimiotácticas em células imunitárias, o que pode modular a resposta imune, servindo de ponte entre a resposta imune inata e adaptativa [46].

O péptido LL-37, a única catelicidina humana conhecida, apresenta um largo espectro de actividades microbidas *in vitro* [47]. O estudo Miyakawa et al. revelou que os macrófagos alveolares são eficientes na produção de LL-37 após infecção com Mtb, sugerindo que a catelicidina destas células pode ser um importante participante na resposta imune inata durante o início da infecção em humanos [48]. Para além disso, no estudo de Radtke e O’Riordan, a co-localização de catelicidina com vacúolos contendo *M. tuberculosis* foi observada concomitantemente com uma diminuição na viabilidade bacteriana [42].

1.2.2.2. Produção de citocinas e quimiocinas

O reconhecimento de Mtb por células fagocíticas leva à activação celular e à produção de citocinas, que por sua vez aumentam o estado de activação das células e a sua produção num complexo processo de regulação cruzada. São também produzidas quimiocinas, que em conjunto com as citocinas, recrutam células inflamatórias (células T, neutrófilos e células NK) para as áreas de infecção, activam as células e coordenam a resposta inflamatória e a resposta imune adaptativa a Mtb, desempenhando um papel crucial no desfecho das infecções micobacterianas [6,49].

IFN- γ – Na tuberculose, esta citocina é produzida principalmente por células T CD4+ e CD8+, assim como por células NK, e estimula uma resposta micobactericida nos macrófagos caracterizada pela produção de NOS [50]. Verifica-se que ratinhos IFN- γ KO são altamente susceptíveis a Mtb virulento [51] e indivíduos deficientes no gene para o IFN- γ ou o seu receptor são mais susceptíveis a sérias infecções micobacterianas, incluindo Mtb [52]. Apesar da produção do IFN- γ sozinha não ser suficiente para o controlo da infecção por Mtb, esta é necessária para a resposta protectora a este patógeno. Foi

Também demonstrada a produção de IFN- γ por macrófagos alveolares infectados por micobactérias dependente de IL-12 [53].

TNF- α – A produção de TNF- α por monócitos, macrófagos e células dendríticas é induzida nestas células após estimulação com micobactérias ou produtos micobacterianos [12]. Esta citocina pró-inflamatória desempenha um papel chave na formação do granuloma [54], induz a activação dos macrófagos, em sinergia com o IFN- γ , e possui propriedades imunoreguladoras [55]. Foi demonstrado que nos macrófagos de ratinho esta citocina desempenha um papel no controlo das micobactérias intracelulares por uma via dependente da produção de NO e uma via independente [56]. É também responsável por estimular respostas apoptóticas nestas células [57]. Ratinhos deficientes em TNF- α ou no seu receptor (TNFR) apresentam susceptibilidade aumentada a Mtb e uma deficiente formação do granuloma após infecção por Mtb. Nos humanos, o facto de doentes que recebem inibidores de TNF- α serem mais susceptíveis à tuberculose evidencia o importante papel desta citocina na defesa do hospedeiro a Mtb [49].

IL-1 β – Outra citocina pró-inflamatória envolvida na resposta do hospedeiro ao Mtb é a IL-1 β . Tal como o TNF- α , é principalmente produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas [58]. A IL-1 β é quimiotáctica para linfócitos e é capaz de activar células T CD4+, causando a sua proliferação e libertação de IFN- γ [59]. Estudos com ratinhos sugerem que a IL-1 β desempenha um papel importante na tuberculose, tendo sido demonstrado que ratinhos com duplo-KO de IL-1 α e -1 β e ratinhos deficientes em IL-1R tipo I, os quais não respondem a IL-1, apresentam um aumento do crescimento micobacteriano, assim como uma formação anormal do granuloma após infecção com Mtb [6].

IL-12 – A IL-12 é um elemento fundamental na defesa do hospedeiro a Mtb. É produzida principalmente por células fagocíticas, e a fagocitose de Mtb parece ser necessária para a sua produção [60]. Esta citocina possui um papel crucial na indução da produção de IFN- γ [61]. Trata-se de uma citocina regulatória que liga a resposta inata e adaptativa do hospedeiro a micobactérias e a qual exerce os seus efeitos protectores principalmente através da indução do IFN- γ [62].

IL-18 – A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória e foi inicialmente descoberta como um factor indutor de IFN- γ , com sinergismo com a IL-12 [61]. Também estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e factores de transcrição [63]. A evidência para um papel protector da IL-18 durante infecções micobacterianas surge da observação que ratinhos IL-18 KO são altamente susceptíveis a BCG e Mtb [64].

IL-6 – É produzida no início das infecções micobacterianas no local da infecção e possui propriedades pro- e anti-inflamatórias [65,66]. Esta citocina pode ser prejudicial nas infecções micobacterianas uma vez que inibe a produção de IL-1 β [67] e foi demonstrado que promove o crescimento *in vitro* de *M. avium* [68]. Por outro lado, um possível papel protector é suportado por estudos em ratinhos deficientes em IL-6 que apresentam uma susceptibilidade aumentada à infecção por Mtb, o que parece estar relacionado com a deficiente produção de IFN- α no início da infecção [6].

Entre as várias quimiocinas secretadas por macrófagos humanos e de ratinho infectados por Mtb, incluem-se a CCL2, CCL3, CCL7, CCL12, CXCL2, e CXCL10 [69]. Estudos *in vitro* e *in vivo* fornecem evidência para a participação das quimiocinas no controlo da TB, sendo a sua produção em macrófagos predominantemente regulada pelo TNF- α [70].

1.2.2.3. Apoptose vs necrose

A morte celular programada, ou apoptose, desempenha um papel importante na resposta da imunidade inata contra patógenos, tratando-se de uma estratégia de defesa conservada evolutivamente que se estende até ao mundo das plantas. É por isso essencial para a persistência dos patógenos intracelulares que estes possuam fortes mecanismos anti-apoptóticos [71].

A importância da apoptose na resposta imune inata do hospedeiro no contexto da infecção micobacteriana foi salientada pela demonstração que a morte celular programada reduzia a viabilidade das micobactérias, o que não acontece com a necrose das células infectadas [72,73]. Para além disso, a relevância da apoptose para a resposta imune adquirida contra o Mtb foi sugerida pela demonstração que a fagocitose de corpos apoptóticos contendo micobactérias por células dendríticas, podia levar à apresentação de antígenos de lípidos e péptidos micobacterianos e à subsequente activação de células T específicas [74].

Assim, a morte celular programada pode constituir outro mecanismo efector do hospedeiro infectado para limitar o crescimento do Mtb, uma vez que a apoptose de células fagocíticas pode prevenir a disseminação da infecção. A sua indução em resposta à infecção por Mtb é dependente de TNF- α e verifica-se que as estirpes patogénicas de Mtb induzem significativamente menos apoptose das células do hospedeiro do que estirpes relacionadas atenuadas [75].

1.3. Métodos convencionais de contagem de UFC para medir sobrevivência intracelular de Mtb – limitações para testes em larga escala

A contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) é um dos métodos mais antigos e mais usados em microbiologia para a quantificação de bactérias numa amostra. Contudo, trata-se de uma técnica muito trabalhosa e que exige períodos de incubação muito prolongados para a quantificação de micobactérias intracelulares de crescimento lento, que podem ir até várias semanas [76]. Realizar ensaios de contagem de UFC para testar grandes números de condições é não só bastante demorado e trabalhoso como dispendioso, sendo necessários grandes números de placas de agar ou tubos de cultura, o que torna este método pouco adequado para rastreios em larga escala. Como tal, são necessárias novas alternativas e métodos mais rápidos que permitam testar, em larga escala, por exemplo, novos agentes antimicobacterianos e alvos terapêuticos [77].

São vários os factores que levam a incorrecções neste método. Nomeadamente, esta técnica não permite quantificar todas as bactérias viáveis inoculadas mas apenas as que são capazes de crescer nas condições em que são cultivadas, o que não acontece com o Mtb latente, por exemplo. Por outro lado, nos ensaios de infecção, o número de bactérias presentes nas amostras analisadas é relativamente elevado, sendo necessário efectuar diluições seriadas 1/10 para quantificar estas amostras, o que leva a um aumento do erro na medição, para além de ser um processo bastante exaustivo [78].

No entanto, apesar destas desvantagens esta técnica permanece a de maior confiança e mais comumente aceite, pelo que quando se desenvolve ou se pretende implementar outro método quantitativo é necessário validá-lo através do método standard da contagem de UFC.

1.4. Activação de macrófagos com LPS

O lipopolissacárido (LPS), componente importante da membrana externa das bactérias Gram-negativas, é um potente activador de macrófagos, levando à produção de mediadores inflamatórios, incluindo intermediários de oxigénio e nitrogénio e citocinas, nomeadamente, IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α [79-81]. A estimulação dos macrófagos com LPS aumenta também a sua actividade quimiotáctica e fagocítica [82], que em conjunto com a produção de citocinas e a capacidade oxidativa, constituem características típicas da activação destas células [83,84].

Foi demonstrado que nos macrófagos o LPS é reconhecido pelo TLR4, ocorrendo a activação dos factores de transcrição *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) e *activator protein-1* (AP-1), induzindo, por fim, a expressão de genes relacionados com a inflamação [85,86].

A principal função dos macrófagos classicamente activados (i.e. activados por sinais tipo-Th1, como o IFN- γ , TNF ou LPS) é a destruição de microrganismos [87]. O aumento da capacidade microbicida dos macrófagos activados com LPS contra bactérias intracelulares encontra-se extensamente documentada na literatura, nomeadamente em estudos com *Listeria monocytogenes* e *Legionella pneumophila*, para citar dois exemplos.

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, estando comprovada a sua sobrevivência e proliferação em macrófagos, células Kupffer, hepatócitos e enterócitos [88]. O estudo Inoue et al. demonstrou que em células J774 pré-tratadas com LPS (0.1 μ g/ml) a proliferação intracelular de *L. monocytogenes* é fortemente inibida [80].

Também o crescimento intracelular da *Legionella pneumophila* é diminuído dentro de 2 dias em células J774 tratadas com 0.1 μ g/ml de LPS, durante 24h antes da infecção, uma das condições óptimas para a activação do *burst* oxidativo destas células, como demonstrado por Kura et.al [89].

1.5. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo desenvolver um ensaio fluorimétrico para medição da sobrevivência/morte intracelular de Mtb em macrófagos humanos, usando dois repórteres fluorescentes. Neste ensaio é utilizada uma estirpe de micobactérias que expressa a proteína verde fluorescente GFP e uma linha celular de macrófagos com marcação nuclear fluorescente azul. Desta forma a sobrevivência intracelular é avaliada através do cálculo do rácio entre a intensidade de fluorescência das micobactérias e dos macrófagos ao longo do período de infecção.

Para estabelecimento do método utilizou-se como modelo de infecção uma estirpe *M. smegmatis* GFP, que por ser uma micobactéria de crescimento rápido é mais vantajosa à optimização do mesmo. Para a obtenção de macrófagos humanos THP-1 com marcação fluorescente foram utilizadas duas abordagens. Primeiro, testou-se o potencial da marcação nuclear fluorescente dos macrófagos com Hoechst, um corante de ligação ao ADN. Em seguida, tentou-se criar uma linha celular THP-1 com marcação fluorescente constitutiva. Para isso construiu-se um plasmídeo integrativo para expressão da proteína azul fluorescente TagBFP, em fusão com três cópias da sequência de localização nuclear.

A segunda parte deste trabalho consistiu em estudar o efeito do LPS na infecção por *M. smegmatis*, tendo em vista a sua utilização como controlo positivo da morte intracelular. Foi utilizado o modelo de infecção de *M. smegmatis* em macrófagos de ratinho J774 por ser um modelo bem

estabelecido no laboratório e analisou-se a sobrevivência intracelular na presença e ausência de estimulação com LPS através do método de contagem de UFC.

Com o desenvolvimento deste método fluorimétrico pretende-se criar uma alternativa mais rápida, menos laboriosa e dispendiosa ao método tradicional de contagem de UFC, e como tal mais adequada à realização de rastreios em larga escala. Afigura-se que este método será potenciador da descoberta de novos agentes antimicobacterianos e novos alvos terapêuticos quer ao nível do hospedeiro, quer da micobactéria.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura de células

As células da linhagem monocítica humana THP-1 (ATCC TIB-202) foram mantidas em meio RPMI-1640 (Invitrogen Gibco) contendo 10% soro fetal de bezerro (FCS; Invitrogen Gibco), 1% L-glutamina (Invitrogen Gibco), 1mM piruvato de sódio (Invitrogen Gibco), 10mM HEPES a pH 7.4 (Invitrogen Gibco), 1x aminoácidos não-essenciais-MEM (Invitrogen Gibco), penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml/100 µg/ml; Invitrogen Gibco) e incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% CO₂. As células foram passadas a cada 2-3 dias de forma a manter uma densidade entre 2x10⁵ e 9x10⁵ células por ml.

Dois dias antes da infecção, foram semeadas 1x10⁵ células por poço, em placas pretas de 96 poços de fundo plano (Corning). Foram incubadas durante a noite em meio de cultura celular (descrito em cima) suplementado com 20 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) para induzir a diferenciação em macrófagos. No dia seguinte, o meio contendo PMA foi substituído por meio novo sem PMA e mantido durante 24 h para assegurar a reversão das células para o fenótipo de macrófagos em repouso.

A linha celular de macrófagos de ratinho J774A.1 (ATCC TIB-67) foi mantida em meio DMEM (Invitrogen Gibco) suplementado com 10% FCS, 1% L-glutamina, penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml/100 µg/ml), em placas de cultura de tecidos (Falcon) e incubada a 37°C numa atmosfera com 5% CO₂. As células foram passadas a cada 2-3 dias por uma diluição 1:10 com novo meio de cultura.

Os macrófagos foram semeados (2,5x10⁵ macrófagos/poço), na véspera da infecção, em placas de cultura celular de 24 poços de fundo plano (Falcon) em 1ml de meio DMEM completo e incubados a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂.

Quando indicado, a estimulação das células J774 com 100 ng/ml, 1 ou 10 µg/ml de LPS (*E. coli* 0111:B4; *S. enterica* serovar Typhimurium; *Klebsiella pneumoniae*; Sigma) foi feita aproximadamente 3 h após as células serem semeadas e mantida durante a noite anterior à infecção, ou feita apenas 3 h antes da infecção. O estímulo foi removido aquando da adição das bactérias.

A linha celular HEK 293T (ATCC CRL-11268) foi cultivada em meio DMEM (descrito em cima) em frascos de cultura de tecidos (Falcon) e incubada a 37°C numa atmosfera com 5% CO₂. A passagem das células foi feita a cada 2-3 dias por uma diluição 1:10 com novo meio de cultura.

2.2 Cultura de bactérias

M. smegmatis mc² 155 possuindo um plasmídeo de expressão de GFP (gentilmente cedida pelo Prof. Douglas Young, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido) foi cultivado em meio contendo Middlebrook's 7H9 broth medium (Difco) e Nutrient broth (Difco) (4,7 g e 5 g por litro, respectivamente), suplementado com 0,05% Tween 80, a 37°C num agitador a 220 r.p.m, até atingir a fase exponencial de crescimento. Para estabilizar a expressão de GFP o meio foi suplementado com higromicina (50 µg/ml; Invitrogen). Foi feita uma sub-cultura das bactérias em meio novo nos dias anteriores às experiências.

Listeria monocytogenes (ATCC 19111) (gentilmente cedida pela Prof. Dra. Aida Duarte, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa) cresceu em meio BHI (*Brain Heart Infusion*; Oxoid), a 37°C num agitador a 220 r.p.m..

2.3 Infecção de macrófagos

A cultura de *M. smegmatis* ou *L. monocytogenes*, em fase exponencial, foi centrifugada a 3500 r.p.m, durante 10 minutos, lavada duas vezes com PBS (*Phosphate buffer saline*) pH 7.4 e ressuspendida em meio de cultura celular apropriado (sem antibióticos). Os agregados de micobactérias foram removidos por tratamento ultrasónico da suspensão bacteriana num banho de ultrassons, durante 15 minutos, passando-se depois a suspensão através de um filtro de 5 µm (Sartorius Stedim Biotech). Foi medida a OD₆₀₀ da suspensão (OD₆₀₀ = 0,1 corresponde a 1x10⁷ bactérias/ml para *M. smegmatis* e a 1x10⁸ bactérias/ml para *L. monocytogenes*) e ajustou-se a OD₆₀₀ de forma a obter uma suspensão de bactérias com uma concentração correspondente à multiplicidade de infecção (MOI) pretendida.

As células foram infectadas com uma MOI 5, 10 ou 20 e o período de internalização das bactérias foi de 1 h. Para remover as bactérias extracelulares, retirou-se o meio de infecção, lavou-se com PBS e incubou-se as células com meio celular apropriado contendo 10 µg/ml de gentamicina (Invitrogen). Em cada tempo de análise, foi medida a sobrevivência das bactérias por UFC ou intensidade de fluorescência. Para determinação das UFC, as células foram lavadas com PBS e lisadas com 300 µl de água esterilizada (ou 1% Igepal CA-630 (Sigma) em água) numa incubação a 37°C, durante 15 minutos, preparando-se diluições seriadas 1:10 em água dos lisados (10⁻¹ a 10⁻⁴). 10 µl de cada diluição foram inoculados, em duplicado, em placas de meio Middlebrook 7H10, no caso de *M. smegmatis* e, em placas de gelose simples, no caso de *L. monocytogenes*. As unidades formadoras de colónias foram contadas após incubação a 37°C durante um dia (*L. monocytogenes*) ou dois dias (*M. smegmatis*). A medição da intensidade de fluorescência das amostras foi feita em 50 µl de PBS, após lavagem com PBS e utilizando o fluorímetro Tecan's Infinite 200® microplate reader para medir a fluorescência de GFP (488 nm excitação/ 520 nm emissão). Cada amostra foi analisada em triplicado e células não infectadas foram usadas como controlos da autofluorescência para cada tempo de medição.

2.4. Marcação dos núcleos de THP-1 com Hoechst

Após incubação, durante a noite, das células THP-1 em meio de cultura celular suplementado com 20 nM de PMA, removeu-se este meio e adicionou-se 50 µl de meio novo contendo Hoechst 33342 (5 µg/ml; Invitrogen) a cada poço. Incubou-se, durante 30 minutos, a 37°C e, depois de lavar com PBS, mediu-se a intensidade de fluorescência no fluorímetro Tecan's Infinite 200® (excitação: 350 nm/ emissão: 461 nm). Poços com o mesmo número de células não marcadas foram utilizados como brancos e cada amostra foi analisada em triplicado.

2.5 Inibição da fagocitose com citocalasina D

As células THP-1 foram incubadas a 37°C em 5% CO₂, durante 30 minutos antes da infecção, com 50 µl de meio (sem antibiótico) contendo diferentes concentrações de citocalasina D (1 µg/ml e 10 µg/ml; Sigma), a qual foi mantida durante a infecção. As células foram infectadas com um volume de 50 µl, durante 1 h e, em seguida lavadas com PBS para remoção das bactérias extracelulares. A intensidade de fluorescência de GFP foi lida no fluímetro Tecan's Infinite 200® (excitação: 488 nm/ emissão: 520

nm). Utilizaram-se poços com o mesmo número de células sem infecção como brancos e cada amostra foi analisada em triplicado.

2.6. Construção do plasmídeo pTagBFP-Nuc

Para a construção do vector de expressão da proteína TagBFP em fusão com NLS (sinal de localização nuclear), o gene que codifica a proteína azul fluorescente TagBFP foi clonado a partir do plasmídeo pTagBFP-C (Clontech) no plasmídeo pEBFP2-Nuc (Addgene). Este último contém três cópias da sequência de localização nuclear (NLS) e possui um gene de resistência à neomicina (Neo^r) que permite a sua selecção (usando G418) em células eucarióticas. Os plasmídeos foram cortados com as enzimas de restrição *NheI* (NEB) e *XhoI* (Roche). Os produtos das digestões, purificados com o kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), foram ligados com a enzima T4 DNA ligase (Roche), para criar a fusão do gene da TagBFP com as três cópias de NLS, ligadas à extremidade 3'. A transformação dos produtos da reacção de ligação foi feita em *E. coli* DH5 α (gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Pedro Simas, Instituto de Medicina Molecular, Universidade de Lisboa), de acordo com o protocolo de *heat shock* [90]. Os transformantes foram seleccionados em meio Luria-Bertani (LB) contendo canamicina (50 μ g/ml). Para confirmar o resultado da clonagem, efectuou-se a extracção dos plasmídeos com o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) e realizou-se uma análise de restrição com a enzima *ApaI* (NEB), que corta a dupla cadeia de DNA do plasmídeo em dois pontos, no inserto e na origem de replicação. Como controlo foram utilizadas células de *E. coli* DH5 α transformadas com o vector sem o inserto. As avaliações de integridade, restrições enzimáticas, extracções e purificações do DNA plasmídico, foram feitas por electroforese em géis de agarose (1%) com *Gelpilot loading dye 5x* (Qiagen). Utilizou-se o tampão de electroforese Tris-Borato EDTA 0.5x (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8.0) e o marcador de pesos moleculares *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

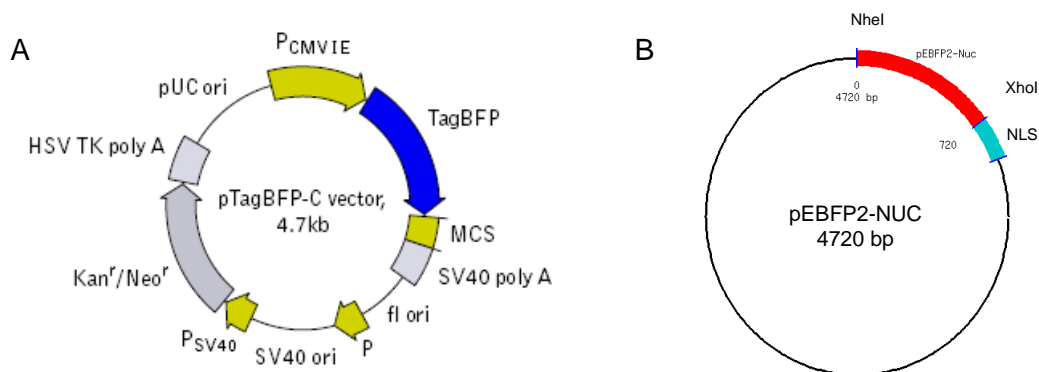


Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo pTagBFP-C (A) e pEBFP2-NUC (B).

2.7 Transfecção células HEK 293T

As células HEK 293T foram transfectadas com o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram obtidas no microscópio Zeiss Axiovert 200M, com uma ampliação de 40x, após 48h.

2.8 RT-PCR

O RNA foi extraído utilizando TRIzol (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada utilizando o Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific). A produção de cDNA fez-se utilizando Superscript II reverse transcriptase seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen), num volume final de reacção de 20µl. Os primers utilizados para RT-PCR quantitativo foram desenhados com o programa Primer3 (Roche Applied Science), de forma a possuírem uma $T_m = 60\%$ e produzirem fragmentos de DNA com ± 200 p.b.. Confirmou-se que os primers não hibridizavam com sequências inespecíficas através do programa BLAST.

Para o RT-PCR quantitativo, o cDNA foi amplificado num volume de reacção de 20µl com 50% de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems), e as reacções foram corridas num ABI 7000 Sequence Detection System com o ABI Prism SDS 7000 software (Applied Biosystems). Todas as amostras foram analisadas em duplicado. Os níveis de expressão foram depois normalizados para a expressão do *housekeeping gene* GAPDH. Segue-se uma lista dos primers utilizados:

GAPDH: Fwd AACTTTGGCATTGTGGAA; Rev ACACATTGGGGGTAGGAACA

iNOS: Fwd CACCTTGGAGTTCACCCAGT; Rev ACCACTCGTACTTGGGATGC

IL-1 β : Fwd CAGGCAGGCAGTATCACTCA; Rev AGCTCATATGGGTCCGACAG

IL-6: Fwd AGTTGCCTTCTTGGGACTGA; Rev CAGAATTGCCATTGCACAAC

TLR4: Fwd GCTTTCACCTCTGCCTTC; Rev GAAACTGCCATGTTTGAG

TNF α : Fwd GAACTGGCAGAAGAGGCACT; Rev AGGGTCTGGGCCATAGAACT

2.9 Microscopia de fluorescência

Na véspera da infecção, as células J774 foram semeadas sobre lamelas de vidro estéreis, colocadas em placas de cultura celular de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células/poço) em 1ml de meio como descrito em cima. As células J774 foram infectadas com *M. smegmatis* GFP (MOI 10) durante 4 h. Para a marcação dos organelos ácidos, o LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes) foi adicionado às células na diluição 1:10.000 em DMEM, durante os últimos 30 minutos da infecção. Após lavagem e fixação das células com paraformaldeído (PFA) 4%, fez-se a montagem das lamelas com meio de montagem (Dako) em lâminas de vidro. As imagens de microscopia confocal foram obtidas usando o microscópio Zeiss LSM 510 META, com uma objectiva de 63x. A percentagem de bactérias GFP co-localizadas com LysoTracker foi determinada analisando pelo menos 9 campos aleatórios de três amostras diferentes por condição experimental. A quantificação foi feita automaticamente utilizando uma Macro do *software* ImageJ 1.44a, desenhada para quantificar a percentagem de pixéis verdes (GFP) co-localizados com pixéis vermelhos (LysoTracker).

Nos ensaios de imunofluorescência, as células foram fixadas com PFA 4% à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A permeabilização das células foi feita com 0,1 % Triton X100 (Sigma) em PBS, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após 15 minutos de *blocking* com 1 % BSA/PBS, as células foram incubadas com o anticorpo primário, durante 30 minutos, seguindo-se outros 30 minutos de marcação com o anticorpo secundário. As imagens de microscopia confocal foram obtidas usando o Zeiss LSM 510 META e a percentagem de co-localização foi calculada por estereologia directa. Utilizou-se o anticorpo primário Mouse Anti-LBPA (6C4) (Echelon) e o anticorpo secundário Alexa Fluor® 568 rabbit anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen).

2.10. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão e a análise estatística foi realizada recorrendo ao *software* SigmaPlot version 11 (Systat Software Inc., CA). As diferenças entre os valores médios de dois grupos, num determinado momento, foram analisadas usando o teste t-Student e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os números de células THP-1 e as intensidades de fluorescência correspondentes obtidas pela marcação com Hoechst foram submetidos a análise de regressão linear.

3. Resultados:

3.1. Métodos para quantificação do número de macrófagos em placa

3.1.1. Marcação nuclear de THP-1 com Hoechst

Os ensaios para a quantificação de micobactérias intracelulares normalmente não incluem a quantificação dos macrófagos e, a ausência deste controlo interno pode levar a uma incorrecta quantificação da infecção. Assim, pretendemos desenvolver um ensaio que utilize, não só bactérias fluorescentes que exprimem constitutivamente a proteína verde fluorescente (GFP), como também células com um repórter fluorescente, de forma a ser possível a sua quantificação ao longo da infecção. Desta forma, o rácio entre a intensidade de fluorescência das micobactérias e das células irá permitir quantificar a internalização e a sobrevivência das micobactérias no interior dos macrófagos.

Para investigar a utilidade da marcação fluorescente do núcleo como um potencial método para a quantificação fluorimétrica das células THP-1, cresceram-se células numa placa preta de 96 poços com diferentes inóculos e marcaram-se as células com Hoechst (5 µg/ml), um corante fluorescente de ligação ao ADN. Em seguida, realizou-se a leitura da intensidade de fluorescência das amostras no fluorímetro Tecan's Infinite 200® microplate reader. Os números de células e os valores da intensidade de fluorescência correspondentes foram submetidos a análise de regressão linear. O gráfico obtido revelou que a intensidade de fluorescência dos núcleos celulares está positivamente correlacionada com o número de células THP-1 ($r^2 = 0,99$; $P < 0,001$) (Fig. 3). Como tal, estes resultados sugerem que a intensidade de fluorescência da marcação dos núcleos celulares parece ser um parâmetro adequado para a quantificação dos macrófagos em placa.

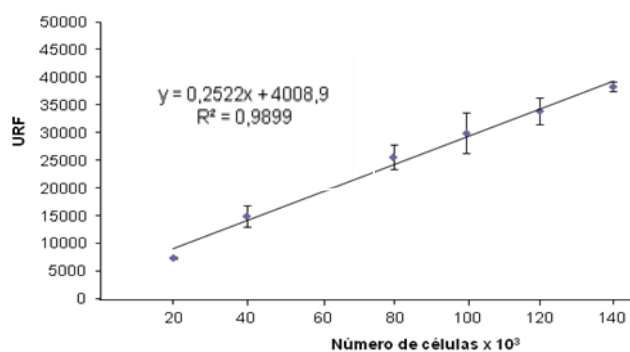


Figura 3. Quantificação fluorimétrica de células THP-1 marcadas com Hoechst. O valor médio da intensidade de fluorescência das células marcadas com Hoechst 33342 (excitação: 350 nm/ emissão: 461 nm) é apresentado em função do número de células por poço (cada ponto representa a média \pm d.p. de triplicados). A linha representa a regressão linear entre o número de células THP-1 e a intensidade de fluorescência correspondente.

3.1.2. Construção de um vector de expressão para marcação nuclear dos macrófagos e transfecção em células HEK 293T

Tendo em conta os resultados anteriores, construiu-se um plasmídeo integrativo para a expressão da proteína fluorescente TagBFP, a proteína azul mais brilhante disponível, actualmente em fusão com

três cópias do sinal de localização nuclear (NLS), o qual é responsável por direccionar a proteína para o núcleo. Este plasmídeo será usado para criar uma linha celular THP-1 com marcação fluorescente nuclear constitutiva, de forma a permitir a quantificação por fluorimetria, dos macrófagos viáveis durante o período de infecção.

Para confirmação da clonagem, o plasmídeo resultante, pTagBFP-Nuc, foi transfectado em células HEK 293T, uma linha celular de fácil transfecção. As imagens foram obtidas no microscópio Zeiss Axiovert 200M, após 48h, tendo-se observado a expressão nuclear da proteína TagBFP (Fig. 4). Como controlo, transfectou-se o plasmídeo pTagBFP-C, que codifica a proteína TagBFP mas não a sequência NLS, observando-se a expressão da fluorescência fora da região nuclear (dados não mostrados).

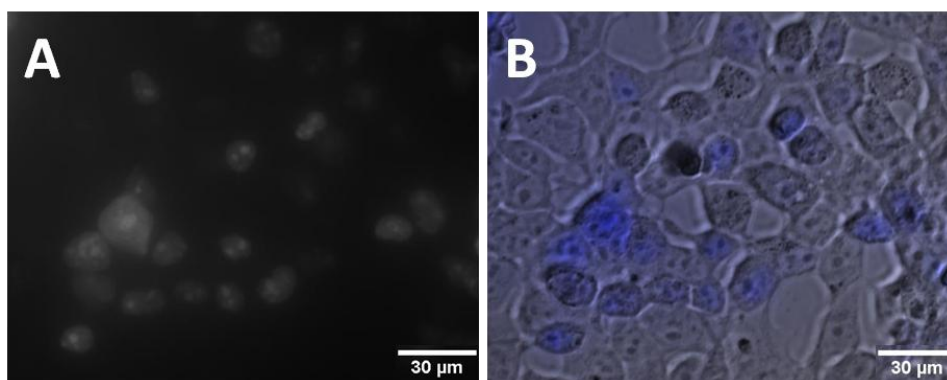


Figura 4. Células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pTagBFP-Nuc. As imagens foram obtidas, após 48 h, com o microscópio Zeiss Axiovert 200M, usando uma ampliação de 40x. (A) aquisição com filtros DAPI (excitação: 359-371nm/ emissão >397nm); (B) sobreposição do canal DAPI com luz transmitida.

3.2. Estabelecimento do método de avaliação da sobrevivência intracelular de micobactérias por fluorimetria e comparação com o método clássico

Em seguida, verificou-se se a marcação fluorescente das bactérias seria um bom parâmetro para a sua quantificação por fluorimetria, durante o ensaio de infecção. Iniciaram-se os estudos com *M. smegmatis* GFP, uma estirpe em uso no laboratório, uma vez que se trata de uma bactéria de crescimento rápido não patogénica, sendo um modelo de infecção mais fácil e bem estudado.

Com este ensaio pretendeu-se comparar a avaliação da sobrevivência intracelular de *M. smegmatis* em células THP-1 por fluorimetria, com o método clássico de contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Para isso, as células THP-1 foram infectadas com diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) de *M. smegmatis* GFP (1, 5 e 10). Ao fim de 1 e 3 h de infecção, a quantificação do número de bactérias internalizadas foi feita, em paralelo, por medição da intensidade de fluorescência (IF) no fluorímetro e por contagem de UFC das amostras.

A análise da intensidade de fluorescência de GFP das bactérias intracelulares, permitiu observar uma distinção entre os valores médios da fluorescência correspondentes às diferentes MOIs. Verificou-se que a um aumento da MOI corresponde um aumento da intensidade de fluorescência, em ambos os tempos de infecção (Fig. 5A), tal com se verificou por contagem de UFC (Fig.5B). Adicionalmente,

observou-se também uma diminuição da intensidade de fluorescência, entre 1 e 3 h de infecção, em todas as MOIs testadas. Estes resultados estão também em concordância com os resultados obtidos pelo método tradicional de contagem de UFC, em que se observa uma diminuição do número de bactérias ao fim de 3 h de infecção, em todas as MOIs.

Estes resultados sugerem que a detecção da intensidade de fluorescência das micobactérias intracelulares poderá ser uma boa alternativa ao método convencional de contagem de UFC, para avaliação da sobrevivência de *M. smegmatis* em macrófagos.

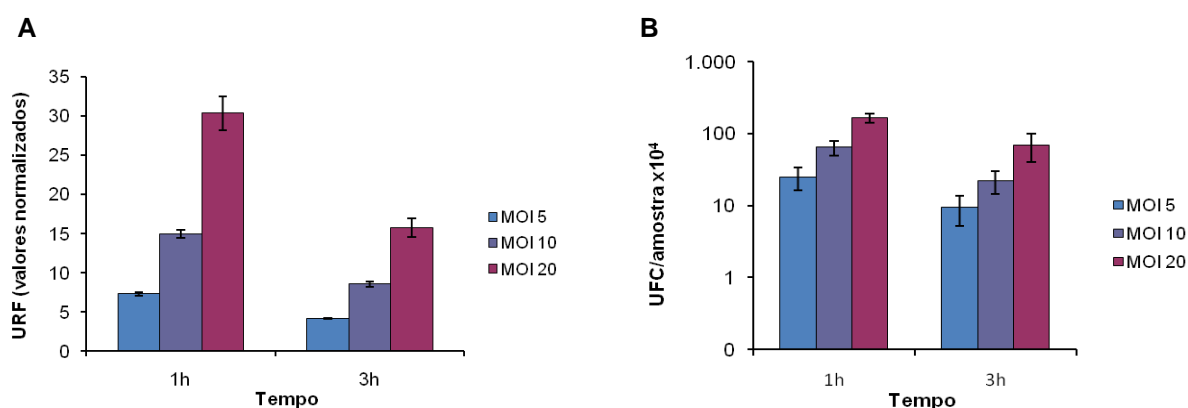


Figura 5. Comparação da fluorescência (URF) e crescimento (UFC) de *M. smegmatis* em células THP1. Quantificação de *M. smegmatis* GFP em macrófagos THP-1 infectados com diferentes MOIs (5, 10 e 20). A medição foi feita por IF (A) e UFC/amostra (B), ao fim de 1 e 3 h de infecção. Os valores de intensidade de fluorescência foram normalizados para o valor do branco (células não infectadas). Os dados são apresentados como média \pm d.p. de triplicados de IF e UFC.

3.3. Controlo negativo de internalização usando citocalasina D

A citocalasina D é um potente inibidor da polimerização da actina, estando descrito o seu efeito na inibição da internalização de várias bactérias [91]. O passo seguinte no estabelecimento do método fluorimétrico, consistiu em testar o efeito da citocalasina D na internalização de *M. smegmatis* em células THP-1, com o objectivo de se utilizar este inibidor como controlo negativo da internalização.

As células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações de citocalasina D (1 e 10 μ g/ml), durante 30 minutos antes da infecção, sendo a concentração do inibidor mantida durante o período de infecção das células. Os macrófagos foram infectados com MOI 10 e 20 de *M. smegmatis* GFP. A análise dos resultados foi feita a partir da leitura da intensidade de fluorescência de GFP das bactérias internalizadas, ao fim de 1 h de infecção.

Verificou-se que as células infectadas com MOI 20 apresentam uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na internalização das bactérias GFP, relativamente ao controlo, para ambas as concentrações de citocalasina D testadas. Observou-se uma tendência de diminuição da internalização das bactérias com o aumento da concentração de citocalasina D utilizada, embora a diferença da intensidade de fluorescência entre as duas concentrações não seja estatisticamente significativa. Contrariamente, nas células infectadas com MOI 10, não se observaram diferenças significativas na internalização das bactérias, relativamente ao controlo, com nenhuma das concentrações testadas (Fig. 6).

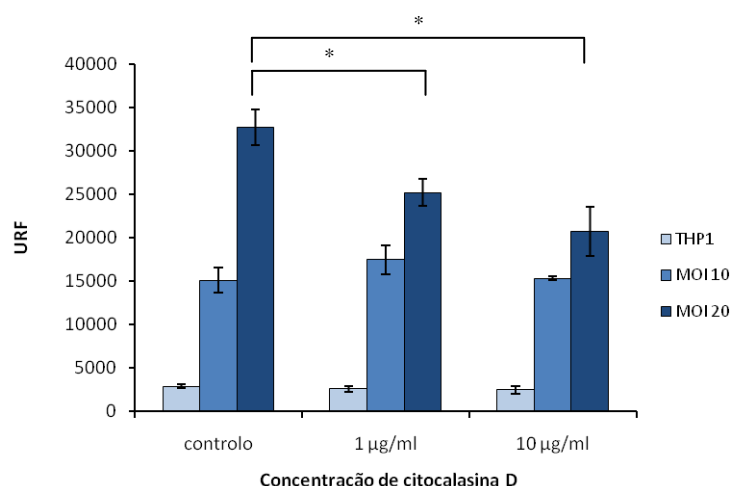


Figura 6. Efeito da citocalasina D na internalização das bactérias. Medição da intensidade de fluorescência de GFP das bactérias internalizadas, ao fim de 1 h de infecção, em células THP-1 tratadas previamente com citocalasina (1 e 10 µg/ml). As células foram infectadas com MOI 10 e 20 de *M. smegmatis* GFP. Poços com células apenas foram utilizados como brancos. Os resultados são apresentados como média \pm d.p. de triplicados. Os asteriscos indicam diferenças significativas relativamente ao controlo determinadas pelo teste t-Student: * $P < 0,05$.

3.4. Aferição da sobrevivência intracelular: Lipopolissarário (LPS) como controlo positivo

3.4.1. Efeito da concentração do LPS na infecção de macrófagos J774 por *M. smegmatis*

A segunda parte deste trabalho teve como objectivo testar o efeito do lipopolissacárido (LPS), potente activador de macrófagos [79], na sobrevivência de *M. smegmatis*, tendo em vista a sua utilização como controlo positivo da morte intracelular na infecção micobacteriana. Para isso, utilizou-se o modelo de infecção de macrófagos J774, um modelo bem estabelecido no laboratório e, acompanhou-se a infecção através da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC).

Começou-se por testar o efeito da estimulação dos macrófagos J774, durante a noite anterior à infecção (o.n.), com diferentes concentrações de LPS de *Klebsiella* (100 ng/ml, 1 µg/ml e 10 µg/ml), na sobrevivência das micobactérias. O crescimento das células e das micobactérias foi sincronizado de forma a proceder-se ao protocolo de infecção. As células praticamente confluentes foram infectadas com uma MOI de 10, utilizando-se bactérias em fase de crescimento exponencial.

O pré-tratamento dos macrófagos com 1 ou 10 µg/ml de LPS o.n. resultou, ao contrário do que se esperava, num aumento significativo ($P \leq 0,001$) da sobrevivência de *M. smegmatis*, relativamente ao controlo, ao fim de 4, 8 e 24 h de infecção. Ao fim da primeira hora, porém, apenas se observou um aumento da sobrevivência em relação ao controlo, nas células estimuladas com 10 µg/ml, embora bastante inferior ao observado nos tempos posteriores e com menor significância estatística ($P < 0,05$). A concentração mais baixa testada, 100 ng/ml, originou resultados menos consistentes ao longo da infecção. Não se verificaram diferenças relativamente ao controlo ao fim de 1 e 8 h pós-infecção (p.i.), observou-se um aumento da sobrevivência às 24 h p.i., embora menos significativo ($P = 0,05$) que os restantes, e registou-se uma tendência inversa à das outras concentrações, ao fim de 4 h de infecção, verificando-se uma diminuição da sobrevivência das bactérias intracelulares, apesar da diferença em

relação ao controlo ser também menos significativa ($P < 0,05$) (Fig. 7A). Os resultados obtidos revelaram ainda que nas células tratadas com LPS não ocorreu uma morte acentuada das bactérias, entre as 4 e 8 h de infecção. É importante salientar que nas células pré-estimuladas, as bactérias intracelulares estão também a ser destruídas ao longo do período de infecção, verificando-se, porém, que diminuem em número a uma menor taxa do que no controlo (Fig.7B).

Apesar de nas células estimuladas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS se observar um aumento na sobrevivência de *M. smegmatis* mais acentuado às 4 e 8 h p.i. relativamente à concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, alguns estudos revelam que esta concentração pode ser citotóxica para os macrófagos [92], pelo que se decidiu utilizar nos ensaios seguintes a concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS para a activação das células.

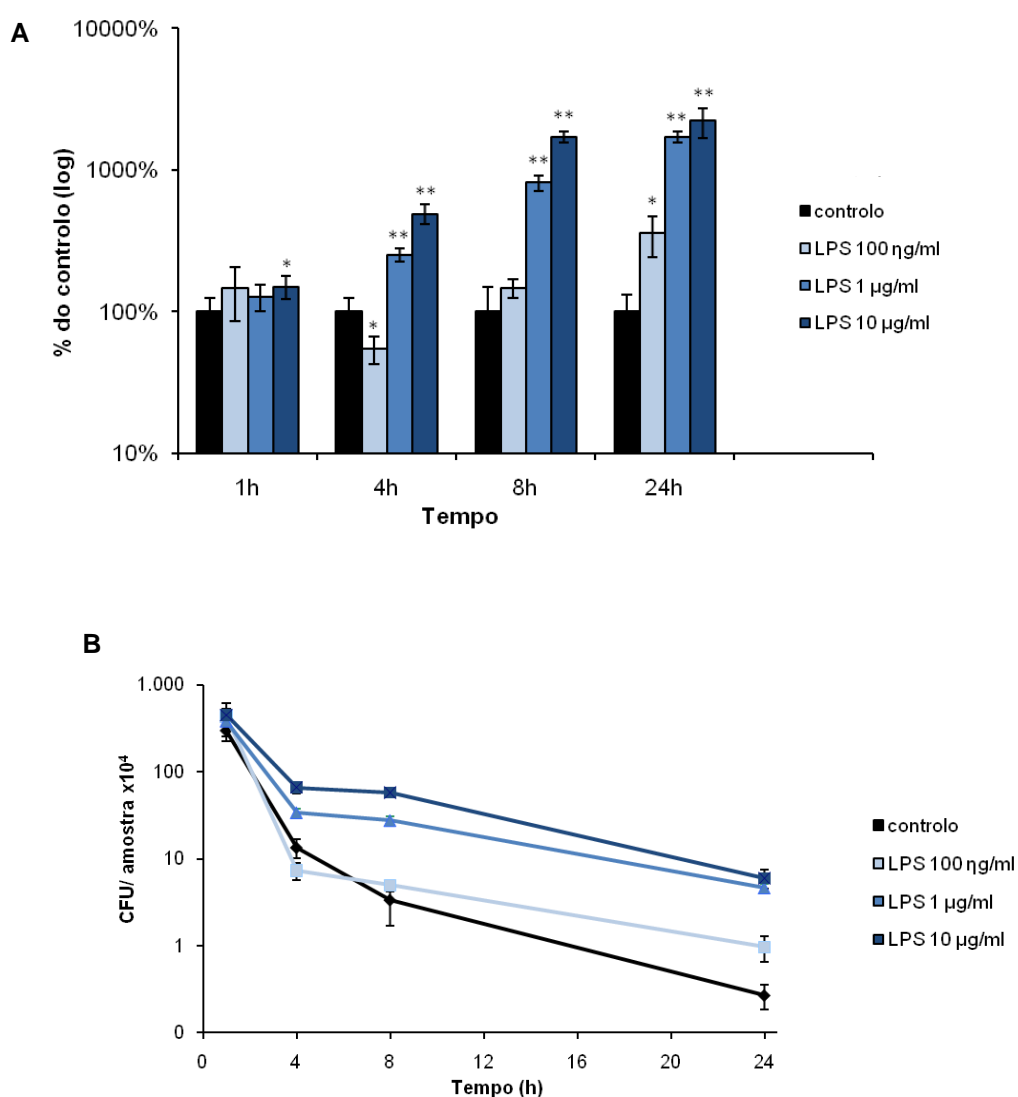


Figura 7. Sobrevivência de *M. smegmatis* em células J774 tratadas com LPS. As células estimuladas o.n. com as concentrações indicadas de LPS foram infectadas com *M. smegmatis* (MOI 10) e foi determinado o número de UFC das amostras nos tempos indicados. Os dados são apresentados como média \pm d.p. de quadruplicados, em percentagem do controlo (A) ou UFC/amostra (B). Os asteriscos indicam diferenças significativas relativamente ao controlo determinadas pelo teste t-Student: * $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.4.2. Efeito da origem do LPS na infecção de macrófagos J774 por *M. smegmatis*

De seguida, procurou-se verificar se o fenótipo observado era independente da origem do LPS utilizado na estimulação dos macrófagos. Para isso, as células J774 foram estimuladas o.n. com LPS (1 µg/ml) de diferentes origens: em paralelo com o LPS de *Klebsiella*, utilizado no ensaio anterior, testou-se LPS de *E. coli* e de *Salmonella*, uma vez que estes se encontram entre os mais frequentemente utilizados em ensaios de activação celular. As células foram infectadas com *M. smegmatis* (MOI = 10) e analisaram-se os resultados por contagem de UFC.

Ao fim da primeira hora de infecção, não se registaram diferenças em relação ao controlo para o LPS de *Salmonella* nem de *Klebsiella*, enquanto o tratamento com LPS de *E. coli* resultou num pequeno aumento da sobrevivência intracelular ($P = 0,001$). Às 4 h p.i., todos os LPS testados levaram a um aumento significativo da sobrevivência ($P \leq 0,001$), aproximadamente 4 vezes superior ao controlo. Por fim, às 24 h de infecção, observou-se igualmente um aumento da sobrevivência para todos os LPS testados ($P \leq 0,001$), cuja diferença em relação ao controlo é superior à observada às 4 h p.i. (Fig. 8). O maior aumento da sobrevivência intracelular (cerca de 25 vezes superior ao controlo) foi observado nas células previamente estimuladas com LPS de *E. coli*, às 24 h de infecção. Baseado neste resultado, decidiu-se utilizar o LPS de *E. coli* nos ensaios seguintes.

Estes resultados demonstram que o aumento da sobrevivência de *M. smegmatis* em macrófagos J774, observado às 4 e 24 h pós-infecção, é consistente para LPS de diferentes espécies, sugerindo que este efeito é independente da origem do LPS.

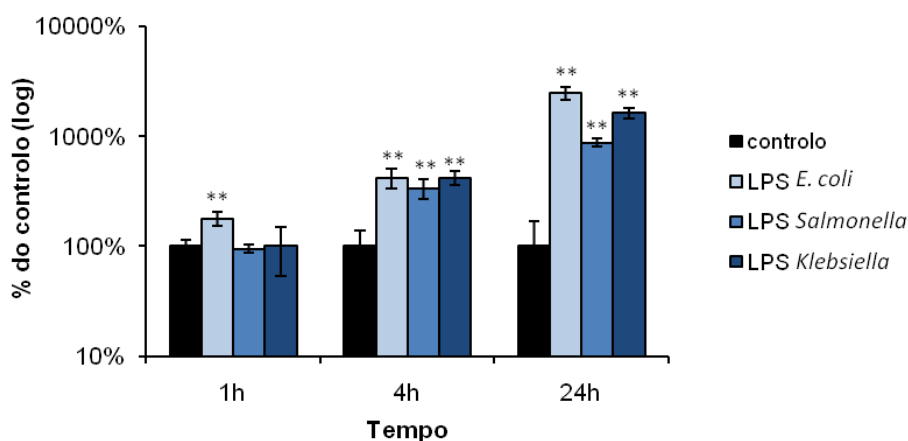


Figura 8. Sobrevivência de *M. smegmatis* em células J774 tratadas com diferentes LPS. As células estimuladas o.n. com 1 µg/ml de LPS de *E. coli*, *Salmonella* e *Klebsiella* foram infectadas com *M. smegmatis* (MOI 10). Foi determinado o número de UFC das amostras nos tempos indicados. Os dados são apresentados como média ± d.p. de quadruplicados, em percentagem do controlo. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controlo determinadas pelo teste t-Student: ** $P \leq 0,001$.

3.4.3. Efeito do tempo de estimulação com LPS na infecção de macrófagos J774 por *M. smegmatis*

Dado que o pré-tratamento dos macrófagos com 1 µg/ml de LPS o.n. aumenta a sobrevivência de *M. smegmatis*, a partir das 4 h de infecção, pretendeu-se verificar se este efeito era dependente do tempo de estimulação dos macrófagos. Assim, realizou-se um ensaio em que as células J774 foram estimuladas com LPS na véspera ou apenas 3 h antes da infecção. A quantificação dos resultados foi feita ao fim de 1 e 4 h após a infecção, por contagem de UFC.

Ao fim da primeira hora de infecção não se verificaram diferenças significativas na sobrevivência intracelular, em relação ao controlo, para nenhuma das condições testadas. Porém, às 4 h p.i., observou-se um aumento significativo ($P \leq 0,001$) da sobrevivência de *M. smegmatis* (aproximadamente 3 vezes o valor do controlo), nas células estimuladas com LPS o.n., à semelhança de ensaios anteriores, enquanto nos macrófagos estimulados com LPS apenas 3 h antes da infecção, o nível de sobrevivência intracelular não diferiu do controlo (Fig. 9). Estes resultados sugerem que o aumento da sobrevivência intracelular nos macrófagos estimulados com LPS é dependente do tempo de estimulação.

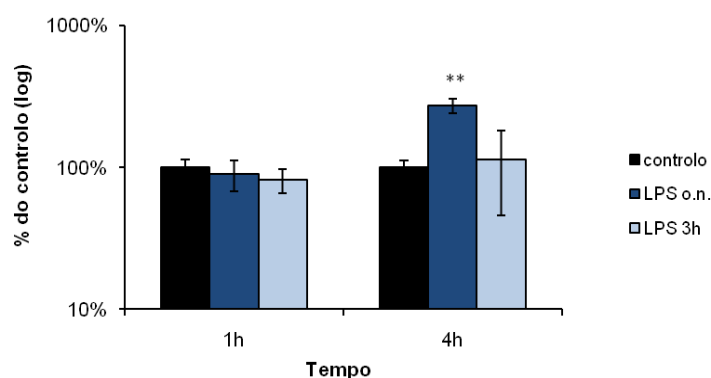


Figura 9. Sobrevivência de *M. smegmatis* em células J774 estimuladas com LPS o.n ou 3 h. As células estimuladas com 1 µg/ml de LPS de *E. coli* o.n. ou 3 h antes da infecção foram infectadas com *M. smegmatis* (MOI 10). Foi determinado o número de UFC das amostras nos tempos indicados. Os dados são apresentados como média \pm d.p. de quadruplicados, em percentagem do controlo. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controlo determinadas pelo teste-t de Student: ** $P \leq 0,001$.

3.4.4. *Listeria monocytogenes* como controlo positivo da morte intracelular em macrófagos J774 activados por LPS

O resultado inesperado obtido anteriormente, do aumento da sobrevivência das micobactérias em células pré-estimuladas com LPS, sugeriu que deveríamos verificar se este resultado ocorria também com outras espécies de bactérias intracelulares, onde o efeito da activação dos macrófagos com LPS na sua sobrevivência já tivesse sido descrito. Assim sendo, decidiu-se usar o modelo de infecção *Listeria monocytogenes*, estando descrito na literatura que esta bactéria é morta mais eficientemente em macrófagos J774 previamente estimulados com LPS [80]. A *L. monocytogenes* seria utilizada como

controlo dos resultados obtidos na infecção por *M. smegmatis* em macrófagos J774 pré-estimulados. No laboratório estabelecemos todos os métodos necessários para cultivar e crescer *L. monocytogenes* de forma consistente e sincronizada com o crescimento de *M. smegmatis* e das células J774, para proceder à infecção.

Assim, realizou-se, em paralelo, um ensaio de infecção de células J774 com *M. smegmatis* (MOI = 10) e *Listeria monocytogenes* (MOI = 10). As células J774 foram previamente estimuladas com LPS de *E. coli* (1 µg/ml) o.n. e, ao fim de 1, 4 e 24 h após a infecção, calculou-se a taxa de sobrevivências das bactérias, relativamente ao controlo, pelo cálculo do número de UFC por amostra.

Em concordância com estudos anteriores [80], ao fim de 24 h de infecção, verificou-se uma redução significativa ($P < 0,001$) no número de UFC de *L. monocytogenes*, de cerca de 1 log, nas células estimuladas com LPS, relativamente ao controlo (Fig. 10A e C). Também em concordância com os resultados descritos, não se observou uma alteração na sobrevivência da bactéria nas células activadas, durante as primeiras 4 h de infecção. Contrariamente, tal como nos ensaios anteriores, na infecção com *M. smegmatis* observou-se um aumento na sobrevivência das bactérias nas células tratadas com LPS, ao fim de 4 e 24 h após a infecção (Fig. 10B e D). No entanto, inversamente ao que foi observado anteriormente, neste ensaio registou-se uma sobrevivência superior ao fim de 4 h do que ao fim de 24 h de infecção.

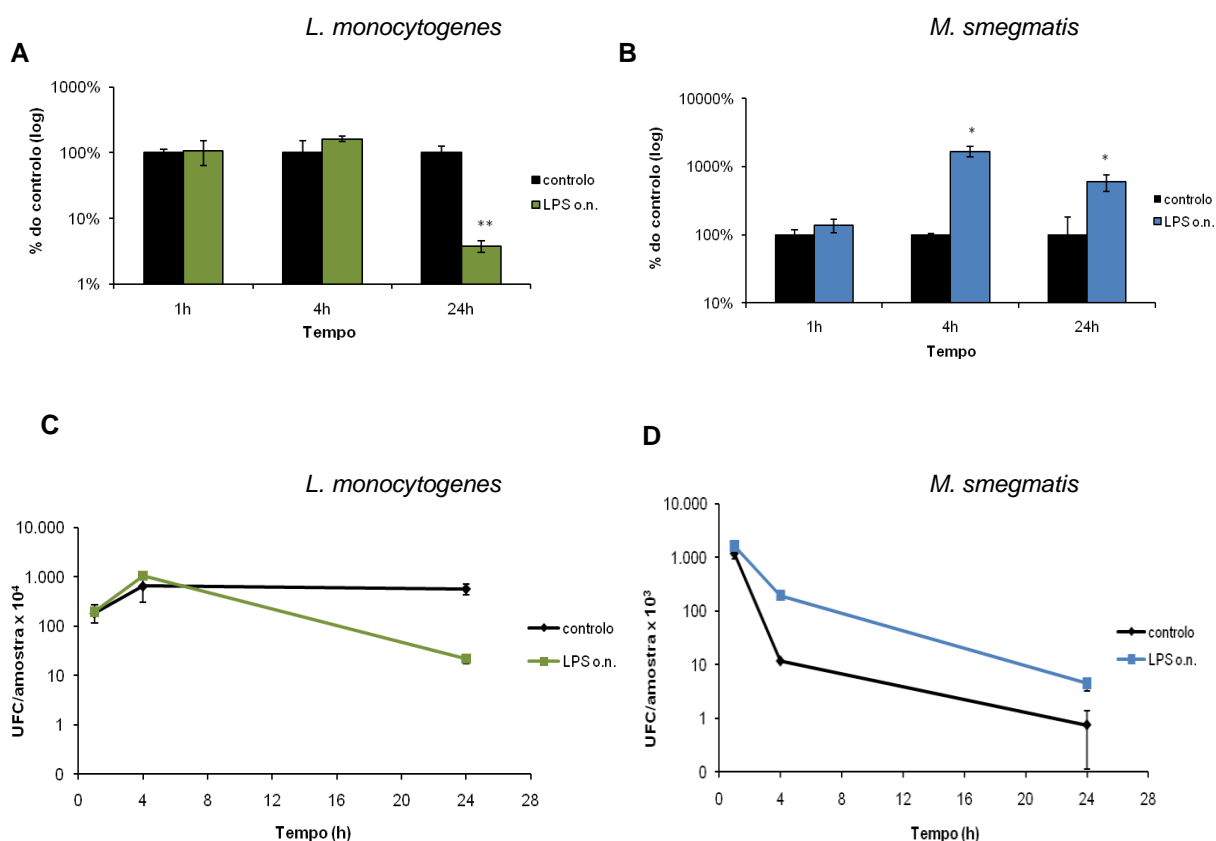


Figura 10. Sobrevivência de *L. monocytogenes* e *M. smegmatis* em células J774 estimuladas com LPS o.n. As células não estimuladas ou estimuladas com 1 µg/ml de LPS de *E. coli* o.n. foram infectadas com MOI 10 de *L. monocytogenes* (A,C) ou *M. smegmatis* (B,D). Foi determinado o número de UFC das amostras nos tempos indicados. Os dados são apresentados como média ± d.p. de quadruplicados, em percentagem do controlo (A,B) ou UFC/ amostra (C,D). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controlo determinadas pelo teste t-Student: * $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.4.5. Mecanismo de acção bactericida dependente de LPS

3.4.5.1. Activação de macrófagos: expressão de iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β e TLR4 nos macrófagos J774 infectadas por *M. smegmatis*

Ao longo deste trabalho ficou demonstrado, através de ensaios de contagem de UCF, que a estimulação dos macrófagos J774 com 1 μ g/ml de LPS o.n. aumenta a sobrevivência de *M. smegmatis*, a partir das 4 h p.i..

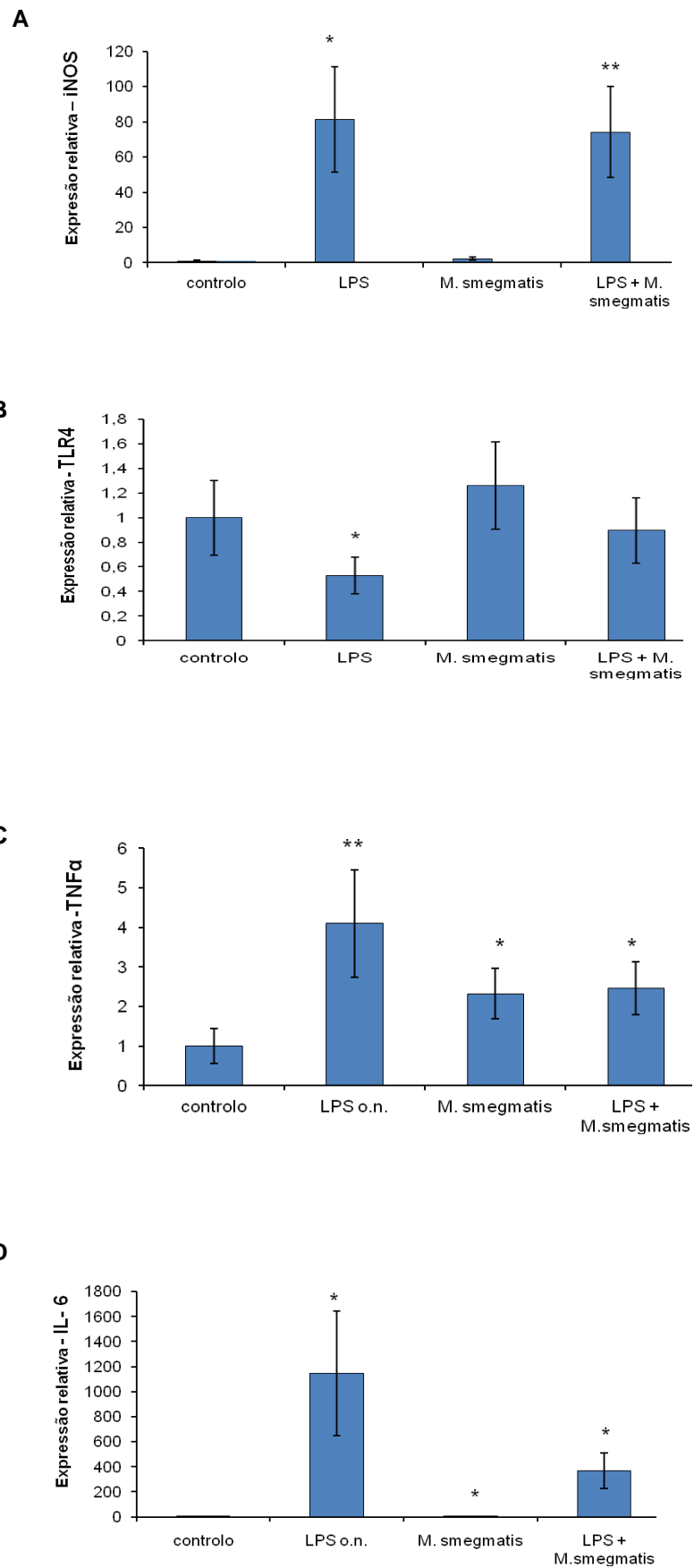
Sabe-se que a estimulação de macrófagos com LPS, que se liga ao receptor TLR4, resulta na activação e translocação nuclear do factor de transcrição NF- κ B, que possui um papel central nas alterações das expressões genéticas durante a resposta inflamatória [85]. Os produtos característicos dos eventos iniciais da resposta imune mediados por NF- κ B incluem a libertação de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, TNF- α e produção de NO mediada pela óxido nítrico sintase indutível (iNOS) [93].

Tendo estes factos em mente, para investigar os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da sobrevivência de *M. smegmatis* em macrófagos previamente estimulados com LPS o.n., decidiu-se realizar uma análise por RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) quantitativo, em que se compararam os níveis de expressão de mRNA de iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α e TLR4. A análise foi feita em células J774 estimuladas com LPS, células infectadas por *M. smegmatis* e células estimuladas com LPS e infectadas, ao fim de 4 h de infecção, de forma a avaliar o possível envolvimento de algum destes factores no fenótipo observado.

Relativamente à expressão de iNOS, registou-se um aumento semelhante nas células estimuladas com LPS o.n., com ou sem infecção, cerca de 80 vezes superior ao controlo. Por outro lado, nas células infectadas por *M. smegmatis*, sem estimulação prévia, observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão deste mRNA, relativamente ao controlo, de apenas aproximadamente 2 vezes, muito inferior ao verificado nas células previamente estimuladas (Fig. 11A). Quanto à expressão do receptor membranar do LPS, o TLR4, verificou-se apenas uma pequena redução significativa ($P < 0,05$) nas células estimuladas com LPS o.n., enquanto as células infectadas, com ou sem estimulação prévia, não apresentam variações significativas, relativamente ao controlo (Fig. 11B). A expressão da citocina pró-inflamatória TNF α , revelou-se cerca de 4 vezes aumentada nas células estimuladas com LPS o.n., enquanto nas células infectadas por *M. smegmatis*, com ou sem estimulação prévia, o aumento foi cerca de metade (Fig. 11C).

Relativamente à expressão de IL-6, nas células pré-estimuladas com LPS o.n., observou-se um aumento superior a 1000 vezes, e de cerca de 370 vezes nas células estimuladas e infectadas, em relação ao controlo. Por sua vez, nas células infectadas por *M. smegmatis*, sem estimulação prévia, detectou-se um aumento significativo ($P < 0,05$), cerca de 3 vezes superior ao controlo (Fig. 11D). Em relação à expressão de IL-1 β , nas células estimuladas com LPS o.n., observou-se um aumento de cerca de 380 vezes, relativamente ao controlo, enquanto que o aumento nas células infectadas e estimuladas o.n., foi de aproximadamente 40 vezes. À semelhança do que se verificou para a IL-6, registou-se uma subida significativa da sua expressão ($P < 0,05$) de cerca de 3 vezes, em células infectadas com *M. smegmatis* não estimuladas (Fig. 11E).

Estes resultados sugerem que nenhum destes factores parece estar envolvido no aumento da sobrevivência intracelular induzido pela estimulação o.n. com LPS.



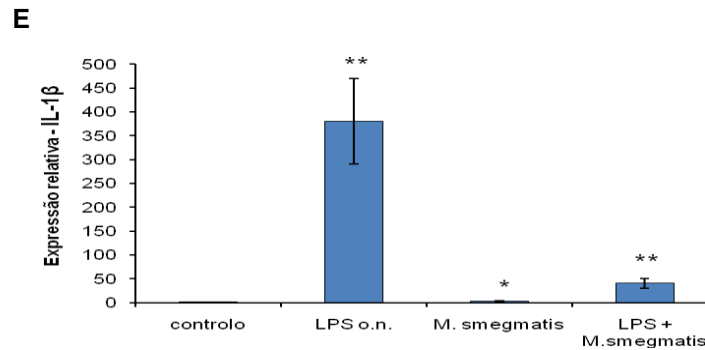


Figura 11. Análise da expressão de iNOS, TLR4, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Expressão relativa dos genes indicados normalizados relativamente a GAPDH, ao fim de 4 horas de infecção com *M. smegmatis* (MOI 10). Dados obtidos por RT-PCR quantitativo a partir de cDNA preparado com células J774 sem estimulação nem infecção (controle), células estimuladas com LPS o.n., células infectadas não estimuladas e células infectadas previamente estimuladas. Os dados são apresentados como média \pm d.p. da expressão de quatro amostras diferentes, em relação ao controle. Os asteriscos indicam diferenças significativas determinadas pelo teste t-Student: * $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.4.5.2. Maturação do fagossoma:

3.4.5.2.1. Co-localização com vesículas acídicas

Em seguida, decidiu-se verificar se o efeito observado estaria relacionado com alterações ao nível da maturação do fagossoma induzidas directamente pelo LPS.

Considera-se que o pH fagossomal é um factor importante para a actividade óptima da maioria das enzimas lisossomais e um pH inferior a 5.5 encontra-se normalmente associado a fagossomas maduros, que estão equipados para matar os patogénios [33]. Decidiu-se, por isso, investigar se as diferenças observadas na morte das micobactérias, entre células não estimuladas, ou estimuladas apenas 3 h antes e, células estimuladas com LPS o.n., poderiam ser explicadas por uma alteração na percentagem de fagossomas acídicos. Para isso, utilizou-se o corante fluorescente LysoTracker red DND99, que se acumula em compartimentos com pH ácido (pH<6), sendo um marcador conhecido de compartimentos acídicos logo, mais bactericidas [94]. As células foram infectadas por *M. smegmatis* que exprimem a proteína verde fluorescente GFP, o que permite a sua detecção por fluorescência em macrófagos infectados. A análise foi feita ao fim de 4 h de infecção, por microscopia confocal, utilizando-se o *software* ImageJ para a quantificação da percentagem de bactérias co-localizadas com o marcador acidotrópico LysoTracker.

Constatou-se que, ao fim de 4 h de infecção, a percentagem de fagossomas acídicos é cerca de 40%, tanto nas células não estimuladas, como nas células tratadas com LPS o.n. ou 3h antes da infecção (Fig. 12). Uma vez que não se observam diferenças significativas entre as várias condições, os resultados sugerem que não é uma alteração na percentagem de fagossomas acídicos que causa o aumento na sobrevivência em células activadas com LPS o.n..

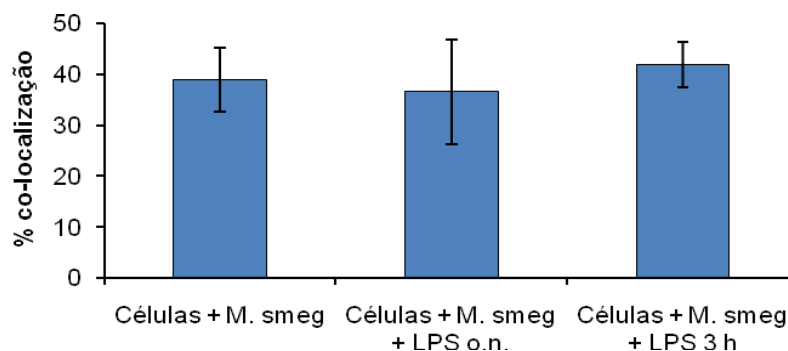


Figura 12. Análise quantitativa da co-localização com vesículas ácidas. Quantificação da percentagem de co-localização de fagossomas contendo *M. smegmatis* GFP com o corante aciditrópico Lysotracker Red, ao fim de 4 h de infecção. A análise foi feita em células não estimuladas, células estimuladas com LPS o.n. ou LPS 3 h, por microscopia confocal. A quantificação foi feita automaticamente utilizando o *software* ImageJ, analisando-se pelo menos nove campos aleatórios de três amostras por condição. Os dados são apresentados como média ± d.p..

3.4.5.2.2. Co-localização com marcador da fase tardia das vias endocíticas

Ao longo do processo de maturação, o fagossoma funde-se com vários componentes da via endocítica, adquirindo marcadores desses compartimentos, que permitem caracterizar o seu estado de maturação [33].

Não se tendo observado uma diferença na acidificação fagossomal, decidiu-se utilizar uma segunda abordagem, analisando a percentagem de co-localização dos fagossomas contendo *M. smegmatis* GFP com o marcador de endossomas tardios, o ácido liso-bisfosfatídico (LBPA). Desta forma, pretendeu-se testar se o efeito do LPS o.n. observado na sobrevivência intracelular estaria relacionado com atrasos ou bloqueios na maturação do fagossoma em fagolisossoma. As amostras foram obtidas ao fim de 4 h de infecção e analisadas por microscopia confocal, tendo sido feita a quantificação da localização por estereologia directa.

Esta análise revelou que, ao fim de 4 h de infecção, a percentagem de co-localização dos fagossomas bacterianos com o LBPA é sensivelmente igual entre o controlo e as células estimuladas com LPS 3 h antes da infecção (cerca de 76%). Por outro lado, as células estimuladas com LPS o.n. apresentam uma percentagem de co-localização de 69%, revelando uma redução significativa ($P < 0,05$) em relação ao controlo e às células estimuladas com LPS durante 3 h (Fig. 13). Estes resultados indicam que a fusão do fagossoma com compartimentos endossomais tardios é ligeiramente diminuída pela activação dos macrófagos com LPS o.n..

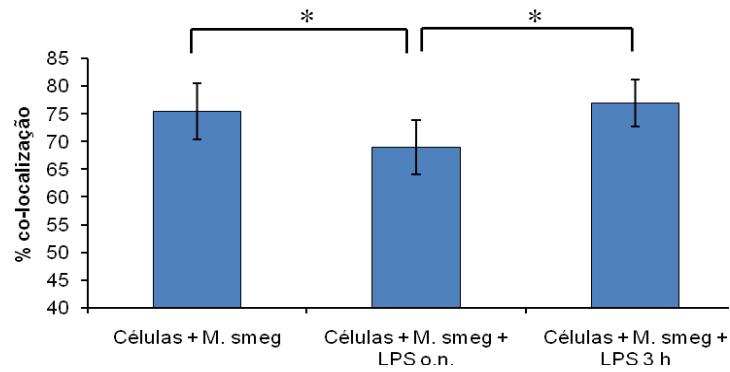


Figura 13. Análise quantitativa da co-localização com LBPA. Quantificação da percentagem de co-localização de LBPA com fagossomas contendo *M. smegmatis* GFP, ao fim de 4 h de infecção. Fagossomas quantificados em células controlo (n=385 fagossomas), em células estimuladas com LPS o.n. (n=399 fagossomas) e em células estimuladas com LPS 3 h (n=403 fagossomas) Os dados são apresentados como média ± d.p. de pelo menos três campos aleatórios, combinados de três amostras para cada condição. Os asteriscos indicam diferenças significativas determinadas pelo teste t-Student: * P< 0,05.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que o estímulo durante a noite com LPS leva a um atraso/bloqueio da maturação do fagossoma em fagolisossoma resultando na maior sobrevivência intracelular de *M. smegmatis*. Concluímos, ainda que o LPS não pode ser usado como controlo positivo de indução de morte intracelular para todos os sistemas bactéria-macrófago.

4. Discussão

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de um ensaio fluorimétrico para avaliar de forma rápida e pouco dispendiosa a internalização e a sobrevivência/morte de Mtb em macrófagos humanos, utilizando dois repórteres fluorescentes. Pretende-se fazer a quantificação simultânea, durante o período de infecção, de bactérias e macrófagos, que expressam uma proteína fluorescente verde (GFP) e azul (TagBFP), respectivamente.

A quantificação de micobactérias intracelulares de crescimento lento pelo método tradicional de contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) é extremamente laboriosa, dispendiosa e requer períodos de incubação que podem ir até 4 semanas, sendo pouco adequada para rastreios em larga escala [76]. A utilização de proteínas fluorescentes como repórteres oferece várias vantagens que possibilitam a avaliação rápida e *in situ* da sobrevivência micobacteriana, enquanto permitem contornar muitas das desvantagens inerentes a outros métodos rápidos. A título de exemplo, são uma boa alternativa aos métodos de detecção através da marcação com compostos radioactivos e, ao contrário dos métodos baseados em genes repórter, como a luciferase, não necessitam da adição de substratos ou cofactores, podendo ser detectadas directamente [95]. Para além disso, são sintetizadas continuamente nas células, evitando a necessidade de fixação, permeabilização ou lise.

Nos ensaios de sobrevivência de micobactérias intracelulares existe um parâmetro que não é, geralmente, quantificado, ao longo da infecção, que consiste no número de macrófagos viáveis presentes na amostra. A quantificação deste controlo interno permitirá avaliar directamente se uma redução no número de bactérias intracelulares pode ser consequência da morte dos macrófagos devido, por exemplo, à citotoxicidade de um composto testado, ao silenciamento de um gene essencial à sobrevivência da célula hospedeira, ou ao próprio parasita.

Os nossos resultados revelaram uma boa correlação entre a intensidade de fluorescência da marcação nuclear das células THP-1 com Hoechst e o número de células por poço (Fig. 3). Como tal, sugerem que a marcação nuclear fluorescente seja um bom método adequado para a quantificação dos macrófagos por fluorimetria. O Hoechst 33342 é um corante fluorescente de ligação ao ADN, com elevada sensibilidade, frequentemente utilizado para a avaliação do ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis por citometria de fluxo [96]. No entanto, apesar de não requerer a permeabilização das células para a sua marcação, tipicamente requer um mínimo de 30 minutos de incubação e o seu sinal pode começar a ser degradado após cerca de 120 minutos. Para além disso, foi demonstrado que o Hoechst 33342 induz a apoptose em várias linhas celulares, de forma dependente do tempo e da dose e, por se intercalar com o ADN, é capaz de alterar a transcrição celular [97]. Como tal, esta técnica de marcação não parece ser ajustada para o nosso modelo, uma vez que se pretendem realizar várias leituras nas amostras vivas, ao longo do período de infecção. Para além disso, de forma a comparar resultados em diferentes tempos de medição, necessitamos que o repórter utilizado apresente um sinal constante, ao longo do tempo. A utilização de uma proteína azul fluorescente com expressão nuclear como repórter, poderá permitir ultrapassar estas limitações. Esta abordagem permitirá realizar várias leituras nas mesmas amostras, sem necessidade de marcação prévia e sem variações significativas no sinal, uma vez que a expressão da proteína deverá ser constante ao longo do tempo, parecendo ser um repórter mais adequado para estudos de cinéticas. Para além disso, não possui citotoxicidade e não deverá interferir com a transcrição celular.

Assim, construiu-se um vector de expressão integrativo, de forma a criar uma linha celular THP-1 com expressão nuclear constitutiva da proteína azul fluorescente TagBFP (máximo de excitação: 402 nm/emissão: 457 nm). Trata-se da proteína azul mais brilhante disponível no mercado e é caracterizada por possuir elevada fotoestabilidade e um pico de emissão estreito, sendo adequada para marcação com proteínas verdes fluorescentes [98]. A fusão da TagBFP com três cópias NLS permitiu a sua expressão nuclear, tal como foi observado nas células HEK 293T transfectadas (Fig. 4). No entanto, será necessário confirmar esta localização utilizando como controlo positivo um repórter conhecido com localização nuclear e emissão de fluorescência noutra gama do visível. Uma opção será o iodeto de propídio, composto com ligação às cadeias de ADN, que emite fluorescência vermelha.

Posteriormente, o plasmídeo será electroporado em células THP-1, que serão seleccionadas com neomicina, para criar a linha celular com marcação nuclear constitutiva. Espera-se que a intensidade de fluorescência da fusão TagBFP-NLS esteja correlacionada com o número de células THP-1, tal como se verificou com o Hoechst, de forma a permitir a quantificação dos macrófagos viáveis em amostras vivas, durante a infecção.

A proteína verde fluorescente (GFP) tem sido usada como repórter em vários organismos, incluindo *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG, sendo a expressão da fluorescência detectada por microscopia, citometria de fluxo ou fluorimetria [99,100]. O facto de ser sintetizada continuamente nas células em divisão [101], possuir baixa toxicidade e resistir bem ao foto-branqueamento (*photobleaching*) quando irradiada com 450 a 490 nm de luz [102], tornam esta proteína um repórter vantajoso.

Os nossos resultados sugerem que a análise da intensidade de fluorescência das bactérias GFP, parece ser um bom método eficaz para a sua quantificação no interior dos macrófagos, por fluorimetria. Foi possível distinguir as diferentes MOIs, num determinado tempo de análise e, observou-se uma redução da intensidade de fluorescência em todas elas, entre 1 e 3 h de infecção, tal como observado pela contagem de UFC (Fig. 5). Este perfil de sobrevivência está de acordo com o que foi descrito em estudos anteriores em macrófagos THP-1 [103]. Assim, os resultados sugerem que este ensaio fluorimétrico parece ser uma alternativa à avaliação da sobrevivência das micobactérias em macrófagos infectados pelo método tradicional de contagem de UFC.

Uma vez que se utilizou um ganho otimizado para a medição da intensidade de fluorescência em cada tempo de análise, os valores absolutos de URF de medições em diferentes tempos de infecção não devem ser comparados. Assim, de forma a comparar a intensidade de fluorescência das bactérias intracelulares ao fim de 1 e 3 h de infecção, os valores foram normalizados pelo valor do branco $[(URF \times - URF \text{ branco}) / URF \text{ branco}]$. A utilização de um ganho fixo, durante a experiência, poderá fornecer dados comparáveis entre diferentes tempos de medição ao longo da infecção, contornando a necessidade de normalização dos valores.

A citocalasina D bloqueia as vias de internalização dependentes de actina, tal como a fagocitose. Vários estudos demonstram que em células tratadas com este inibidor se observa, consequentemente, uma redução no número de bactérias internalizadas [104]. Os nossos resultados revelaram que a citocalasina D parece ser um bom controlo negativo da internalização de *M. smegmatis* em THP-1, no caso da infecção com MOI 20, no ensaio fluorimétrico, em placas de 96 poços. Verificou-se que em células infectadas com MOI 20, o tratamento com 1 ou 10 µg/ml de citocalasina D permite observar uma diminuição significativa do número de bactérias internalizadas, comparativamente ao controlo, registando-se uma diminuição da intensidade de fluorescência das amostras tratadas (Fig. 6). Foi demonstrado num estudo anterior que a

concentração de 10 µg/ml de citocalasina D não altera a adesão das células THP-1 [105]. Desta forma, concluímos que a redução da intensidade de fluorescência observada corresponde a uma menor internalização das bactérias e não a uma perda de células infectadas, durante as lavagens, devido ao tratamento. Contrariamente, na infecção com MOI 10 não foi possível observar diferenças significativas entre o controlo e as células tratadas. Uma hipótese que poderá explicar este resultado, é a presença na amostra, ao fim de 1 h de infecção, de bactérias que não foram internalizadas, apesar da lavagem das células. Consequentemente, a intensidade de fluorescência detectada corresponde ao sinal emitido pelas bactérias intracelulares e pelas bactérias não internalizadas, aderentes à superfície das células. Assim, contrariamente à MOI 20, nas células infectadas com MOI 10, o sinal emitido pelas bactérias internalizadas poderá não ser suficientemente forte para que as diferenças na intensidade de fluorescência provocadas pela citocalasina D sejam perceptíveis. Para tentar contornar esta limitação técnica, poderia-se experimentar marcar as amostras com Trypan Blue, de forma a tentar reduzir o sinal do *background* emitido pelas bactérias extracelulares. O Trypan Blue é um agente impermeável às membranas que tem sido utilizado para monitorizar a internalização em células de mamíferos de vários agentes infecciosos marcados com fluorescência, incluindo GFP [106-109].

A segunda parte deste trabalho teve como objectivo testar o LPS como controlo positivo para o aumento da morte intracelular na infecção de macrófagos por *M. smegmatis*. A escolha deste estímulo baseou-se no facto do LPS se encontrar descrito na literatura como um potente activador de macrófagos, levando a um aumento da capacidade microbida destas células contra várias bactérias intracelulares, nomeadamente, *Listeria monocytogenes* e *Legionella pneumophila* [110,111].

A capacidade de macrófagos de ratinho matarem ou inibirem drasticamente o crescimento de bactérias intracelulares, após activação das células com LPS ou IFN-γ, foi também comprovada contra várias micobactérias, incluindo Mtb, *M. leprea* e *M. avium* [112-114]. Contrariamente, neste trabalho, foi demonstrado que os macrófagos de ratinho J774 activados com LPS, não só falham em mostrar uma capacidade aumentada para controlar a infecção por *M. smegmatis*, como levam consistentemente a um aumento da sobrevivência das micobactérias intracelulares. Este efeito inesperado foi observado a partir das 4 h de infecção, em células pré-estimuladas com LPS o.n. (Fig. 7). Obteve-se um fenótipo idêntico tratando as células com LPS de diferentes espécies, o que sugere que o efeito parece ser independente da origem do LPS usado para a estimulação dos macrófagos (Fig. 8). No entanto, foram apenas testados LPS de três espécies diferentes (*E. coli*, *S. enterica* e *K. pneumoniae*), não constituindo uma amostra significativa. Para além disso, estudos anteriores em macrófagos peritoniais de animais experimentais demonstraram que a origem da endotoxina pode influenciar a determinação das respostas dos macrófagos [115,116].

Por outro lado, os nossos resultados revelam que o efeito do LPS na infecção de macrófagos J774 por *M. smegmatis* é dependente do tempo de estimulação das células, uma vez que, ao contrário da estimulação o.n., a estimulação dos macrófagos apenas 3 h antes da infecção não resulta em alterações na sobrevivência das bactérias intracelulares relativamente ao controlo (Fig. 9). Podemos também concluir que o efeito induzido pelo LPS na sobrevivência de *M. smegmatis* resulta de uma reprogramação das respostas do macrófago que é desencadeada em tempos anteriores à infecção, quer pelo LPS, quer por factores

solúveis induzidos nas células em resposta à activação pelo LPS, tendo em conta que o factor estimulante é removido do meio antes da infecção.

Os resultados obtidos em paralelo nas mesmas condições experimentais com *L. monocytogenes*, permitiram o estabelecimento de um controlo positivo para este estudo. Verificou-se uma diminuição da sobrevivência intracelular desta bactéria em células J774 pré-estimuladas com LPS, ao fim de 24 h de infecção (Fig. 10), tal com descrito em trabalhos anteriores [80]. Podemos, assim, afirmar que a activação dos macrófagos, durante o mesmo período de tempo e com a mesma concentração de LPS, resulta em diferentes consequências dependendo da bactéria internalizada.

Nos macrófagos estimulados com LPS o.n., a curva de sobrevivência das micobactérias intracelulares vai, tal como no controlo, diminuindo ao longo das 24 h de infecção. Contudo, a diferença entre o número de bactérias intracelulares nestas células, em comparação com células não estimuladas, vai aumentando ao longo do tempo (Fig. 7B). Assim sendo, o LPS poderá induzir uma alteração em um ou vários dos mecanismos microbicidas do macrófago, resultando numa morte menos eficiente das bactérias intracelulares, em células activadas por LPS. O facto da sobrevivência intracelular em relação ao controlo ir aumentando ao longo do tempo, parece indicar que este efeito é devido a um mecanismo contínuo.

O facto de não se observarem diferenças significativas no número de bactérias intracelulares entre o controlo e as células estimuladas, ao fim da primeira hora de infecção, sugere que o LPS não interfere com os eventos iniciais da infecção. No entanto, está descrito na literatura que os macrófagos activados por LPS apresentam um aumento da capacidade de fagocitose [82]. Como tal, não se pode excluir esta hipótese. Diferenças no número de bactérias internalizadas entre as amostras poderão não ser detectadas ao fim de 1 h devido a limitações técnicas. Nesta fase da infecção, ainda se encontram presentes na amostra muitas bactérias que não foram internalizadas. Apesar da lavagem, estas não são totalmente removidas, sendo também quantificadas pelo método. A utilização de uma técnica que permita analisar célula a célula, como é o caso da citometria de fluxo, poderia possibilitar contornar este erro e testar se o LPS induz, na verdade, um aumento da internalização de *M. smegmatis*.

Os macrófagos sintetizam e libertam uma variedade de mediadores inflamatórios durante várias horas após a exposição inicial ao LPS. Estes incluem o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO [117,118]. Sabe-se que algumas citocinas como o TNF- α promovem a maturação dos fagossomas micobacterianos, assim como a morte das micobactérias intracelulares, apesar de os mecanismos intracelulares envolvidos serem pouco compreendidos [94,119].

Os nossos resultados de expressão dos genes pró-inflamatórios analisados, revelaram níveis elevados de IL-6 e IL-1 β nas células infectadas pré-estimuladas com LPS o.n., comparativamente às células infectadas não estimuladas (Fig. 11D e E). Revelaram também um nível de expressão de TNF- α idêntico entre estas duas condições experimentais (Fig. 11C). Podemos, assim, concluir que estes mediadores inflamatórios não parecem estar envolvidos no aumento da sobrevivência intracelular induzido pelo LPS. Os resultados obtidos permitem ainda confirmar a activação celular resultante da estimulação com LPS, pela secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 nestas células, característica do fenótipo de activação dos macrófagos [92]. Para além disso, o nível de expressão destes genes nas células infectadas e estimuladas é inferior ao das células apenas estimuladas, sugerindo que *M. smegmatis* é capaz de modular os níveis de expressão induzidos pelo LPS.

O LPS é um ligando específico do TLR4. Logo, este receptor desempenha um papel crucial na mediação da activação do macrófago induzida por LPS [82]. Os nossos resultados revelaram que, ao fim de 24 h de estimulação com LPS, a expressão do gene que codifica o receptor se encontra diminuída (Fig. 11B), em concordância com o estudo anterior em células J774 de Hua et al. [120]. Em relação às células infectadas, com ou sem estimulação prévia, não se observam diferenças significativas, sugerindo que este receptor também não está envolvido no mecanismo responsável pelo aumento da sobrevivência intracelular.

A produção de óxido nítrico (NO) pela sintase indutível do óxido nítrico (iNOS), em macrófagos activados, está envolvida no controlo das infecções micobacterianas [121]. Foi demonstrado que em células J774 infectadas por *M. smegmatis* são produzidos níveis detectáveis de NO apenas durante as primeiras 2 h de infecção, sugerindo que a contribuição da iNOS para a morte de *M. smegmatis* deverá ocorrer apenas durante este período restrito [19]. Foi também previamente demonstrado nestas células que a expressão de iNOS é induzida pelo tratamento com LPS, levando ao aumento da produção de NO [122]. Ao fim de 4 h de infecção, os nossos resultados revelam um nível de expressão do mRNA de iNOS muito superior em células infectadas previamente estimuladas, comparativamente a células infectadas não estimuladas (Fig. 11A). Como tal, verificando-se uma expressão do gene iNOS superior nas células em que se regista maior sobrevivência das micobactérias, os resultados sugerem que a produção de NO não parece estar relacionada com as alterações na sobrevivência induzidas pelo LPS. Porém, uma vez que a contribuição da iNOS para a morte intracelular deverá ser restrita às primeiras 2 h de infecção, seria importante analisar o nível de expressão deste gene antes do final desse período, de forma a confirmar este resultado. Por outro lado, como existem vários mecanismos de regulação pós-transcricional do NO, seria relevante fazer uma análise de detecção da sua libertação no meio, através do reagente de Griess, por exemplo, para confirmar que este factor não está relacionado com o aumento da sobrevivência.

Colectivamente, os resultados indicam que nenhum destes factores parece estar envolvido no mecanismo responsável pelo aumento da sobrevivência de *M. smegmatis* em células estimuladas com LPS o.n..

O principal mecanismo responsável pela eliminação das micobactérias nos macrófagos é a fusão do fagossoma com compartimentos endossomais tardios/ lisossomas. Foi demonstrado que em macrófagos infectados por *M. smegmatis* este mecanismo é iniciado entre as 2 e 4 h de infecção [19]. A fusão com estes compartimentos entrega ao fagossoma a v-ATPase vacuolar e enzimas lisossomais, sendo que a actividade destas enzimas a baixo pH é geralmente considerado o principal factor responsável pela morte das micobactérias [123-126].

Os nossos resultados em células infectadas, com ou sem estimulação prévia, não revelaram diferenças de co-localização dos fagossomas bacterianos com o marcador acidotrópico LysoTracker. Ao fim de 4 h de infecção, a percentagem de fagossomas ácidos observada foi cerca de 40% (Fig. 12), à semelhança de resultados anteriormente descritos por Anes et al., em células J774 [19]. Podemos, assim, concluir que o aumento da sobrevivência intracelular que se observa nas células estimuladas com LPS o.n. não parece estar relacionado com alterações ao nível da acidificação fagossomal. Uma hipótese que explica estes resultados é que, embora um baixo pH esteja classicamente associado à maturação do fagossoma, não implica que este possua, por exemplo, determinadas enzimas lisossomais necessárias à sua actividade microbicida. Estas podem ser adquiridas mais tarde, durante a fusão com os endossomas tardios. Os

complexos de v-ATPases, responsáveis pela acidificação dos compartimentos intracelulares [127], encontram-se em grande número nos endossomas tardios e lisossomas [128,129], considerados os compartimentos celulares mais ácidos, mas estão também presentes na membrana plasmática, em número reduzido [130,131]. O ponto em que os complexos de v-ATPases são adicionados à via endocítica precoce ainda não foi determinado [17]. O fagossoma pode, por isso, adquirir a bomba de prótons a partir de outras fontes para além dos endossomas tardios. No estudo Anes et al. foi demonstrado que apenas 2% das vesículas que possuem v-ATPase co-localizam com LAMP 1, possivelmente o marcador mais utilizado para endossomas tardios e lisossomas [19].

A maturação fagossomal envolve a fusão progressiva com organelos da via endocítica. Por esta razão, o estado de maturação pode ser estabelecido pela análise da presença ou ausência de marcadores específicos, característicos de organelos individuais, na membrana ou no conteúdo dos fagossomas [33].

O nosso estudo da co-localização dos fagossomas contendo *M. smegmatis*, com o marcador de endossomas tardios, o ácido liso-bisfosfatídico (LBPA), revelou uma redução da co-localização deste marcador induzida pela estimulação com LPS o.n. (Fig. 13). Isto indica que nestas células os fagossomas deverão apresentar diferenças no seu conteúdo, em relação ao controlo. Como tal, estes resultados sugerem que o aumento da sobrevivência das bactérias intracelulares nas células estimuladas com LPS o.n. poderá estar, pelo menos em parte, relacionado com uma redução na fusão com este tipo de compartimentos endossomais tardios, perceptível ao fim de 4 h de infecção, embora não interfira com o grau de acidificação fagossomal. Estes resultados estão em concordância com o estudo de Tsang et al., que verificou que macrófagos activados exibiam uma diminuição na fusão dos fagossomas com lisossomas sem uma diminuição das taxas de acidificação [111].

Existem vários tipos os endossomas tardios que se fundem com o fagossoma [19]. Como tal, a análise da co-localização com outros marcadores de endossomas tardios/ lisossomas, como Rab7 e a proteína membranar associada a lisossomas 1 (LAMP 1), poderá revelar diferenças ainda mais acentuadas. Contudo, é importante ter em consideração que a classificação da maturação dos fagossomas, tendo por base a presença de marcadores membranares com origem em compartimentos endossomais, não implica que essas fusões resultem, em determinada altura, em alterações funcionais do fagossoma. Apenas uma análise funcional nos poderia revelar se esta observação se traduz de facto em diferenças na actividade microbida do fagossoma, o que poderia explicar o aumento na sobrevivência intracelular observado.

Para além de alterações na fusão, a estimulação o.n. com LPS poderá provocar modificações no conteúdo dos lisossomas. Tal poderia implicar diferenças nos perfis de hidrólise fagossomal, mesmo que a alteração da fusão não fosse muito evidente. Neste contexto, Russell et al. verificou que macrófagos activados com LPS apresentam apenas um ligeiro aumento da capacidade proteolítica dos lisossomas [132]. Como tal, esta possível alteração não deverá estar relacionada com o aumento da sobrevivência intracelular.

No nosso estudo, o tratamento das células com LPS durante 3 h não resulta numa alteração da sobrevivência intracelular, como se verifica em resultado da estimulação o.n.. Foi anteriormente demonstrado em células J774, que a estimulação dos macrófagos com LPS, apenas durante 2 h, resulta em níveis de libertação de TNF- α e IL-1 β significativamente inferiores aos que se observam em resultado da estimulação durante 24 h [133]. Estes resultados sugerem que um maior nível de activação dos macrófagos,

desencadeado por um maior período de estimulação, poderá estar relacionado com as diferenças observadas, resultando num aumento da sobrevivência intracelular.

O estudo de Russell et al. demonstrou que a capacidade hidrolítica do fagossoma é reprogramada de forma bastante diferente em resposta a estímulos clássicos de activação, LPS e IFN- γ [132]. Nos macrófagos activados o fagossoma apresenta-se menos proteolítico e a morte dos microrganismos deverá depender mais da produção de intermediários reactivos de oxigénio e nitrogénio. Os autores propõem que este facto poderá estar relacionado com os diferentes papéis que o macrófago desempenha no organismo. A principal função dos macrófagos, na ausência de estímulos inflamatórios, é a remoção de restos celulares, como células apoptóticas, dos tecidos. Para esta actividade o compartimento fagossomal dos macrófagos não activados deverá ser altamente degradativo, permitindo o eficiente processamento do material, sem indução da resposta imune. Por outro lado, no contexto da activação, o macrófago passa a desempenhar funções de uma célula imune efectora. Os autores sugerem que as alterações fisiológicas que se verificam no fagossoma podem permitir aumentar o tempo de semi-vida dos epítomos de forma a maximizar a capacidade de apresentação de antígenos nos macrófagos activados a linfócitos T. Esta hipótese poderá estar relacionada com os nossos resultados, no sentido em que o aumento da sobrevivência intracelular poderá dever-se a uma capacidade degradativa inferior nos macrófagos com estimulação prolongada por LPS, possivelmente relacionada com o aumento da apresentação de antígenos. Não observamos, contudo, mecanismos dependentes de NO alterados nos nossos resultados, indicando que a activação de macrófagos com LPS, durante a infecção por *M. smegmatis*, apenas resulta num atraso na maturação do fagossoma, logo, na menor capacidade hidrolítica da célula hospedeira.

5. Conclusão

Os resultados obtidos mostram que a avaliação da sobrevivência intracelular de *M. smegmatis* por fluorimetria, utilizando a proteína GFP como repórter, parece ser uma boa alternativa ao método tradicional de contagem de UFC.

A sua aplicação ao estudo de micobactérias de crescimento lento permitirá reduzir o tempo de obtenção de resultados de semanas para dias. Para além disso, trata-se de uma metodologia menos laboriosa e dispendiosa e a utilização do formato de 96 poços permite realizar facilmente ensaios em triplicado, fornecendo resultados mais consistentes. No seu conjunto, estas características tornam este método adequado à realização de testes em larga escala.

Uma vez que o objectivo final é a aplicação desta metodologia para rastreios em *Mycobacterium tuberculosis*, o ensaio continuará a ser optimizado utilizando uma micobactéria de crescimento lento, uma estirpe *M. bovis* BCG que exprime a proteína GFP, disponível no laboratório.

Relativamente ao emprego do LPS como controlo positivo, os nossos resultados permitem concluir que o LPS na infecção por *M. smegmatis* será um controlo de sobrevivência intracelular e não de morte induzida por activação de macrófagos.

Os resultados obtidos permitem assim demonstrar que a activação dos macrófagos não leva a um aumento geral e inespecífico da actividade microbida destas células, como é geralmente considerado. Em vez disso, revelam que as interacções entre macrófagos activados e microrganismos são dependentes do tipo de activação e do tipo de microrganismo alvo.

As respostas microbidas dos macrófagos activados baseiam-se provavelmente em interacções complexas de vários fenómenos antimicrobianos. Apesar de ser possível que múltiplos mecanismos estejam a provocar este efeito, propomos a existência de uma ligação directa entre os efeitos do LPS o.n. na célula hospedeira e a maturação do fagossoma contendo *M. smegmatis*.

Novos estudos comparando macrófagos com ou sem estimulação com LPS deverão ser úteis para a definição das actividades celulares necessárias para o controlo do crescimento das micobactérias pelos macrófagos que permanecem por ser claramente identificadas.

6. Referências Bibliográficas

1. Murray JF: Tuberculosis and HIV infection: a global perspective. *Respiration* 1998, 65:335-342.
2. Anes E, Kuhnel MP, Bos E, Moniz-Pereira J, Habermann A, Griffiths G: Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* 2003, 5:793-802.
3. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC: Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 1999, 282:677-686.
4. Brewer TF: Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 2000, 31 Suppl 3:S64-67.
5. Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, Martin-Casabona N, Drobniewski F, Gilpin C, Havelkova M, Lepe R, et al.: Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:380-387.
6. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW: Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:294-309.
7. Clemens DL, Horwitz MA: Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995, 181:257-270.
8. Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L: The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 2003, 57:641-676.
9. Russell DG: Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 2007, 5:39-47.
10. Ernst JD: Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1998, 66:1277-1281.
11. Chow CW, Downey GP, Grinstein S: Measurements of phagocytosis and phagosomal maturation. *Curr Protoc Cell Biol* 2004, Chapter 15:Unit 15 17.
12. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL: Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 1997, 159:635-643.
13. Crump JW, Geist LJ, Auron PE, Webb AC, Stinski MF, Hunninghake GW: The immediate early genes of human cytomegalovirus require only proximal promoter elements to upregulate expression of interleukin-1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992, 6:674-677.
14. Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD: Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, 15:760-770.
15. Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS: Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* 2002, 169:3565-3573.
16. Paul-Clark MJ, McMaster SK, Belcher E, Sorrentino R, Anandarajah J, Fleet M, Sriskandan S, Mitchell JA: Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNFalpha in macrophages: role of TLRs in synergy between the two. *Br J Pharmacol* 2006, 148:1067-1075.
17. Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG: Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* 1996, 15:6960-6968.

18. Hestvik AL, Hmama Z, Av-Gay Y: Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* 2005, 29:1041-1050.
19. Anes E, Peyron P, Staali L, Jordao L, Gutierrez MG, Kress H, Hagedorn M, Maridonneau-Parini I, Skinner MA, Wildeman AG, et al.: Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages. *Cell Microbiol* 2006, 8:939-960.
20. Chan ED, Chan J, Schluger NW: What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 25:606-612.
21. Jagannath C, Actor JK, Hunter RL, Jr.: Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nitric Oxide* 1998, 2:174-186.
22. Choi HS, Rai PR, Chu HW, Cool C, Chan ED: Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:178-186.
23. Sable SB, Goyal D, Verma I, Behera D, Khuller GK: Lung and blood mononuclear cell responses of tuberculosis patients to mycobacterial proteins. *Eur Respir J* 2007, 29:337-346.
24. Morris KR, Lutz RD, Choi HS, Kamitani T, Chmura K, Chan ED: Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. *Infect Immun* 2003, 71:1442-1452.
25. Long R, Light B, Talbot JA: Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:403-405.
26. Greenberg SS, Xie J, Kolls J, Mason C, Didier P: Rapid induction of mRNA for nitric oxide synthase II in rat alveolar macrophages by intratracheal administration of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995, 209:46-53.
27. Jaeger T, Budde H, Flohe L, Menge U, Singh M, Trujillo M, Radi R: Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 2004, 423:182-191.
28. Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB: Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1988, 140:634-640.
29. Haas A: The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* 2007, 8:311-330.
30. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998, 92:3007-3017.
31. Sinai AP, Joiner KA: Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* 1997, 51:415-462.
32. Muller WA, Steinman RM, Cohn ZA: The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. *J Cell Biol* 1980, 86:304-314.
33. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S: Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 2002, 366:689-704.
34. Desjardins M: Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 1995, 5:183-186.
35. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V: Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 1997, 272:13326-13331.
36. Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N, Aoyama M, Wada Y: Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci* 2009, 122:2504-2513.

37. Jordao L, Bleck CK, Mayorga L, Griffiths G, Anes E: On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cell Microbiol* 2008, 10:529-548.
38. Armstrong JA, Hart PD: Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 1971, 134:713-740.
39. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA: *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect Immun* 2000, 68:5154-5166.
40. Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S: *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* 1996, 156:4764-4773.
41. Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR: Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1987, 156:985-989.
42. Radtke AL, O'Riordan MX: Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 2006, 8:1720-1729.
43. Ganz T: Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* 2002, 109:693-697.
44. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ: The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* 2001, 58:978-989.
45. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 1993, 11:105-128.
46. Ganz T: Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:710-720.
47. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM: The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:9541-9546.
48. Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, Costello ML, Mathieu-Costello O, Lehrer RI, Catanzaro A: In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996, 64:926-932.
49. Berrington WR, Hawn TR: *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 2007, 219:167-186.
50. Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, Young HA, Wynn TA, Sher A: NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2006, 177:7086-7093.
51. Marquis JF, LaCourse R, Ryan L, North RJ, Gros P: Disseminated and rapidly fatal tuberculosis in mice bearing a defective allele at IFN regulatory factor 8. *J Immunol* 2009, 182:3008-3015.
52. Ottenhoff TH, de Boer T, Verhagen CE, Verreck FA, van Dissel JT: Human deficiencies in type 1 cytokine receptors reveal the essential role of type 1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Microbes Infect* 2000, 2:1559-1566.
53. Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z: Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest* 1999, 103:1023-1029.
54. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989, 56:731-740.

55. Orme IM, Cooper AM: Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999, 20:307-312.
56. Bekker LG, Freeman S, Murray PJ, Ryffel B, Kaplan G: TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J Immunol* 2001, 166:6728-6734.
57. Shaughnessy LM, Swanson JA: The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci* 2007, 12:2683-2692.
58. Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z: Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996, 64:399-405.
59. Hunninghake GW, Glazier AJ, Monick MM, Dinarello CA: Interleukin-1 is a chemotactic factor for human T-lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 1987, 135:66-71.
60. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH: Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun* 1997, 65:1936-1938.
61. O'Neill LA, Greene C: Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998, 63:650-657.
62. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM: Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997, 186:39-45.
63. Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW: Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol* 2000, 30:3057-3060.
64. Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira S: Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect Immun* 1999, 67:2585-2589.
65. VanHeyningen TK, Collins HL, Russell DG: IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J Immunol* 1997, 158:330-337.
66. Nagabhushanam V, Solache A, Ting LM, Escaron CJ, Zhang JY, Ernst JD: Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol* 2003, 171:4750-4757.
67. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990, 75:40-47.
68. Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, Newton C, Klein TW, Friedman H, Anderson BE: Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 2002, 70:4564-4570.
69. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR: Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 1997, 159:3595-3602.
70. Bhatt K, Salgame P: Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 2007, 27:347-362.

71. Briken V: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions and their potential for the discovery of new drug targets. *Curr Drug Targets* 2008, 9:150-157.
72. Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G: Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med* 1994, 180:1499-1509.
73. Keane J, Shurtleff B, Kornfeld H: TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following Mycobacterium tuberculosis infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner. *Tuberculosis (Edinb)* 2002, 82:55-61.
74. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH: Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 2003, 9:1039-1046.
75. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H: Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997, 65:298-304.
76. Takii T, Yamamoto Y, Chiba T, Abe C, Belisle JT, Brennan PJ, Onozaki K: Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:2533-2539.
77. Srivastava R, Deb DK, Srivastava KK, Loch C, Srivastava BS: Green fluorescent protein as a reporter in rapid screening of antituberculosis compounds in vitro and in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 253:431-436.
78. Kharatmal S, Jhamb SS, Singh PP: Evaluation of BACTEC 460 TB system for rapid in vitro screening of drugs against latent state Mycobacterium tuberculosis H37Rv under hypoxia conditions. *J Microbiol Methods* 2009, 78:161-164.
79. Meng F, Lowell CA: Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 1997, 185:1661-1670.
80. Inoue S, Itagaki S, Amano F: Intracellular killing of Listeria monocytogenes in the J774.1 macrophage-like cell line and the lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant LPS1916 cell line defective in the generation of reactive oxygen intermediates after LPS treatment. *Infect Immun* 1995, 63:1876-1886.
81. Amura CR, Kamei T, Ito N, Soares MJ, Morrison DC: Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J Immunol* 1998, 161:2552-2560.
82. Wu TT, Chen TL, Chen RM: Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference. *Toxicol Lett* 2009, 191:195-202.
83. Nathan CF: Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987, 80:1550-1560.
84. Aderem A: Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* 2003, 187 Suppl 2:S340-345.
85. Fan H, Peck OM, Tempel GE, Halushka PV, Cook JA: Toll-like receptor 4 coupled G1 protein signaling pathways regulate extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and AP-1 activation independent of NFkappaB activation. *Shock* 2004, 22:57-62.

86. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ: Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 2001, 69:1036-1044.
87. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Konttinen YT: Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60:2334-2346.
88. Kuhn M, Goebel W: Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 1989, 57:55-61.
89. Kura F, Suzuki K, Watanabe H, Akamatsu Y, Amano F: Difference in *Legionella pneumophila* growth permissiveness between J774.1 murine macrophage-like JA-4 cells and lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant cells, LPS1916, after stimulation with LPS. *Infect Immun* 1994, 62:5419-5423.
90. Sambrook J, Russel DW: *Molecular cloning: a laboratory manual* edn 3: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
91. Elliott JA, Winn WC, Jr.: Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1986, 51:31-36.
92. Amano F, Akamatsu Y: A lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant isolated from a macrophagelike cell line, J774.1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. *Infect Immun* 1991, 59:2166-2174.
93. Hayden MS, West AP, Ghosh S: NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 2006, 25:6758-6780.
94. Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V: Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 1998, 111 (Pt 7):897-905.
95. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG: Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42:344-347.
96. Chiu L, Cherwinski H, Ransom J, Dunne JF: Flow cytometric ratio analysis of the Hoechst 33342 emission spectrum: multiparametric characterization of apoptotic lymphocytes. *J Immunol Methods* 1996, 189:157-171.
97. Li L, Yang L, Kotin RM: The DNA minor groove binding agents Hoechst 33258 and 33342 enhance recombinant adeno-associated virus (rAAV) transgene expression. *J Gene Med* 2005, 7:420-431.
98. Subach OM, Gundorov IS, Yoshimura M, Subach FV, Zhang J, Gruenwald D, Souslova EA, Chudakov DM, Verkhusha VV: Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chem Biol* 2008, 15:1116-1124.
99. Dhandayuthapani S, Via LE, Thomas CA, Horowitz, Deretic D, Deretic V: In *Molecular Microbiology*. Edited by; 1995:901-912. vol 17.]
100. Kremer L, Baulard A, Estaquier J, Poulain-Godefroy O, Locht C: Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. In *Molecular Microbiology*. Edited by; 1995:913-922. vol 17.]
101. Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S: Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* 1996, 173:47-52.
102. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994, 263:802-805.
103. Miller BH, Shinnick TM: Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in resistance to killing by human macrophages. *Infect Immun* 2000, 68:387-390.

104. Bukholm G: Effect of cytochalasin B and dihydrocytochalasin B on invasiveness of entero-invasive bacteria in HEp-2 cell cultures. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 1984, 92:145-149.
105. Pierres A, Eymeric P, Baloché E, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P: Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys J* 2003, 84:2058-2070.
106. Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, Ferracin F, Nieto C, Espinosa M, Landmann R: Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect Immun* 2005, 73:8397-8401.
107. Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R: A single-step, sensitive flow cytometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils. *Cytometry A* 2004, 58:201-206.
108. Joling P, Bakker LJ, Van Strijp JA, Meerloo T, de Graaf L, Dekker ME, Goudsmit J, Verhoef J, Schuurman HJ: Binding of human immunodeficiency virus type-1 to follicular dendritic cells in vitro is complement dependent. *J Immunol* 1993, 150:1065-1073.
109. Scott AJ, Woods JP: Monitoring internalization of *Histoplasma capsulatum* by mammalian cell lines using a fluorometric microplate assay. *Med Mycol* 2000, 38:15-22.
110. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY: Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 1998, 160:1290-1296.
111. Tsang AW, Oestergaard K, Myers JT, Swanson JA: Altered membrane trafficking in activated bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 2000, 68:487 - 494.
112. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V: Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 2004, 119:753-766.
113. Sibley LD, Franzblau SG, Krahenbuhl JL: Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect Immun* 1987, 55:680-685.
114. de Chastellier C, Frehel C, Offredo C, Skamene E: Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice. *Infect Immun* 1993, 61:3775-3784.
115. Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H: The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 181:968-975.
116. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994, 298 (Pt 2):249-258.
117. Larsen GL, Henson PM: Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 1983, 1:335-359.
118. Sweet MJ, Hume DA: Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 1996, 60:8-26.
119. Flesch IE, Kaufmann SH: Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1990, 58:2675-2677.
120. Hua KF, Hsu HY, Chao LK, Chen ST, Yang WB, Hsu J, Wong CH: *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance CD14 endocytosis of LPS and promote TLR4 signal transduction of cytokine expression. *J Cell Physiol* 2007, 212:537-550.

121. Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs WR, Jr., Gicquel B, Guilhot C: Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:10955-10960.
122. Chen BC, Chou CF, Lin WW: Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric-oxide synthase induction in J774 macrophages. Role of intracellular calcium. *J Biol Chem* 1998, 273:29754-29763.
123. Lowrie DB, Andrew PW, Peters TJ: Analytical subcellular fractionation of alveolar macrophages from normal and BCG-vaccinated rabbits with particular reference to heterogeneity of hydrolase-containing granules. *Biochem J* 1979, 178:761-767.
124. Silva MT, Appelberg R, Silva MN, Macedo PM: In vivo killing and degradation of *Mycobacterium aurum* within mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1987, 55:2006-2016.
125. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG: Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994, 263:678-681.
126. de Chastellier C, Lang T, Thilo L: Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. *Eur J Cell Biol* 1995, 68:167-182.
127. Nishi T, Forgacs M: The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:94-103.
128. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G: Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 1994, 124:677-688.
129. Beron W, Alvarez-Dominguez C, Mayorga L, Stahl PD: Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* 1995, 5:100-104.
130. Grinstein S, Nanda A, Lukacs G, Rotstein O: V-ATPases in phagocytic cells. *J Exp Biol* 1992, 172:179-192.
131. Nanda A, Gukovskaya A, Tseng J, Grinstein S: Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase C. Role in neutrophil pH regulation. *J Biol Chem* 1992, 267:22740-22746.
132. Yates RM, Hermetter A, Taylor GA, Russell DG: Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 2007, 8:241-250.
133. Kalupahana RS, Mastroeni P, Maskell D, Blacklaws BA: Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunology* 2005, 115:462-472.

}